

4558e



**ESTUDIO DE LA OBTENCION DE PLANTAS VIA
EMBRIOGENESIS SOMATICA EN PLATANO (*Musa* AAB Simmonds)
VARIEDAD HARTON**

**LUIS CARLOS HERNANDEZ CHARRIS
YOVANY DE JESUS RODRIGUEZ MOLINA**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERIA AGRONOMICA
SANTA MARTA D.T.C.H.
1999**

**ESTUDIO DE LA OBTENCION DE PLANTAS VIA
EMBRIOGENESIS SOMATICA EN PLATANO (*Musa* AAB Simmonds)
VARIEDAD HARTON**

**LUIS CARLOS HERNANDEZ CHARRIS
YOVANY DE JESUS RODRIGUEZ MOLINA**

**Memoria de grado presentada como requisito
parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo**

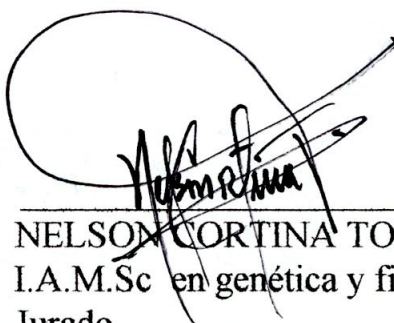
**Director
HUGO OSVALDO JIMENEZ SAENZ
I.A. Ph.D.**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE INGENIERIA AGRONOMICA
SANTA MARTA D.T.C.H
1999**

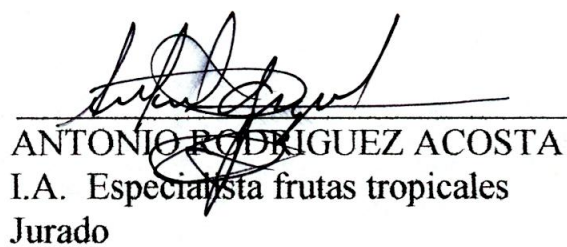
IA
004373

024828

Nota de Aceptación



NELSON CORTINA TOVAR
I.A.M.Sc en genética y fitomejoramiento
Jurado



ANTONIO RODRIGUEZ ACOSTA
I.A. Especialista frutas tropicales
Jurado

Santa Marta, agosto de 1999

DEDICATORIA

Dedico a:

La creación, porque comprendo que soy una obra magistral surgida de la inmensidad de Dios.

Mis padres, porque me trajeron a este mundo, me forjaron a ser lo que hoy soy y han sido el apoyo incondicional de tantas realizaciones a lo largo de mi vida.

Mis hermanos Rosa, Fabiola, Esteban, y Hernando, por compartir mis sueños.

Mi esposa, por acompañarme en la apasionante aventura diaria de vivir y darme fortaleza en los vientos en contra.

Mi hija Stefanía, por cambiar positivamente mi vida.

Mi amigo Yovany, porque me diste la oportunidad de que me escucharas y compartieras mis penas y alegrías.

Mis maestros, especialmente a Oswaldo y Nelson, por mostrarme el camino para lograr mi plena realización.

La facultad de Ciencias Agropecuarias, programa de Ingeniería Agronómica, por apoyarme en la lucha por alcanzar mis metas.

CARLOS

DEDICATORIA

A mis padres, Marina y José Domingo, por su amor, comprensión y confianza.

A mis hermanos, por compartir conmigo el sueño de ser un profesional y apoyarme para poder llevarlo a cabo.

A mis tíos Ramona y Luis, por su apoyo incondicional durante mi estadía en Santa Marta.

A mis primas Damaris, Ninfa e Iris.

A mis sobrinos, la nueva generación familiar.

A Rosiris, mi gran amiga, por estar siempre dispuesta a escucharme.

A mis amigos y compañeros de estudios, especialmente a Sonia, Camelia, Adriana, Osiris, Rildo, Alecy, Alex, Rafael, José, Jesús, Yovany, Delmides y Geovany.

A Luis Carlos, amigo incondicional y compañero de tesis.

A mis profesores, especialmente a quienes no se conformaron con transmitir sus conocimientos sino que me supieron orientar e incentivar para superarme cada día.

Al equipo del Laboratorio de Biotecnología: Nelson, Liliana y Oswaldo, por la confianza depositada y por su apoyo.

YOVANY

“El presidente y los jurados examinadores de la memoria de grado no se harán responsables por los conceptos y juicios emitidos por los autores”

Artículo 147, literal F del Reglamento Interno de la Universidad del Magdalena.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus más sinceros agradecimientos a las siguientes personas y entidades por su invaluable colaboración:

Dr HUGO OSWALDO JIMENEZ SAENZ. I.A. Ph.D. en genética y fitomejoramiento. Profesor de la Universidad del Magdalena. Director Laboratorio de Biotecnología. Director de la memoria de grado.

Dr. NELSON CORTINA TOVAR. I.A. M.Sc en genética y fitomejoramiento. Profesor de la Universidad del Magdalena. Jurado examinador de la memoria de grado.

Dr. ANTONIO RODRIGUEZ ACOSTA. I.A. Especialista en Frutas Tropicales. Profesor de la Universidad del Magdalena. Jurado examinador de la memoria de grado.

Dra. LILIANA CORTINA PEÑARANDA. I.A. Especialista en Ciencias Ambientales. Profesora de la Universidad del Magdalena.

Dra. DIOMARA SUAREZ SEGURA. I.A. Funcionaria del C.I. CARIBIA de la Corporación Colombiana de Investigaciones Agropecuarias “CORPOICA”.

Dr. JORGE GADBAN REYES I.A. Profesor de la Universidad del Magdalena.

CARLOS BUELVAS ALVARADO. Auxiliar del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Magdalena.

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

LABORATORIO DE BIOTECNOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA

A todas aquellas personas que de una u otra forma ayudaron a culminar con éxito la presente investigación.

CONTENIDO

	pág.
RESUMEN	22
INTRODUCCION	26
2. ANTECEDENTES	28
2.1. GENERALIDADES	28
2.2. CALLOGENESIS	30
2.3. CARACTERISTICAS DE LOS CALLOS	32
2.4. EFECTO DE LOS REGULADORES EN LA CALLOGENESIS	34
2.5. CALLOGENESIS EN BANANO Y PLATANO	35
2.6. EMBRIOGENESIS SOMATICA	38
2.7. EFECTO DE LOS REGULADORES EN LA EMBRIOGENESIS SOMATICA	39
2.8. EMBRIOGENESIS SOMATICA Y REGENERACION DE PLANTAS EN BANANO Y PLATANO	41
3. MATERIALES Y METODOS	44
3.1. LOCALIZACION	44
3.2. FASES DE LA INVESTIGACION	44

3.2.1. Fase de inducción de callos	44
3.2.2. Fase de multiplicación de callos (etapa intermedia)	44
3.2.3. Fase de regeneración de plantas	44
3.3. TRABAJO PRELIMINAR PARA OBTENCION DE CALLO CON VITROPLANTAS	45
3.3.1. Montaje del trabajo preliminar con vitroplantas	45
3.3.2. Selección de los explantes y siembra en medio de inducción de callos	47
3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA INVESTIGACION	48
3.4.1. En la fase de inducción de callos	48
3.4.2. En la fase de multiplicación de callos	50
3.4.3. En la fase de regeneración de plantas	50
3.5. MATERIALES UTILIZADOS	50
3.5.1. Material vegetal	50
3.5.2. Reactivos	52
3.5.3. Implementos y equipos de laboratorio	52
3.6. DESARROLLO DEL TRABAJO	52
3.6.1. Preparación de medios de cultivo	52
3.6.2. Selección del material en campo	54
3.6.3. Desinfección del material vegetal y extracción del meristemo	54

3.6.4. Siembra de explantes en medio en blanco	56
3.6.5. Obtención de explantes para siembra en medio de inducción de callos	56
3.6.6. Siembra de los explantes en medio de inducción de callos	58
3.6.7. Realización de subcultivos	58
3.6.8. Pesada de los callos	60
3.6.9. Transferencia de callos a medio para multiplicación de callos	61
3.6.10. Selección del material para la fase de regeneración	61
3.6.11. Siembra en el medio de regeneración	62
3.6.12. Subcultivo de explantes en la fase de regeneración	62
3.6.13. Siembra de plántulas en medio básico	64
3.6.14. Observaciones al estereoscopio y al microscopio	64
3.7. PARAMETROS EVALUADOS	64
3.7.1. En la fase de inducción de callos	64
3.7.2. En la fase de multiplicación de callos	65
3.7.3. En la fase de regeneración de plantas	66
4. RESULTADOS Y DISCUSION	68
4.1. TRABAJO PRELIMINAR	68
4.1.1. Comportamiento de los explantes.	68

4.1.2. Producción de callo	69
4.2. FASE DE INDUCCION DE CALLOS	70
4.2.1. Efecto del tipo de explante en la formación de callos.	70
4.2.2. Peso del callo.	77
4.2.3. Tiempo de formación de los callos.	80
4.2.4. Tasa de crecimiento de los callos	84
4.2.5. Características de los callos	87
4.3. FASE DE MULTIPLICACION DE LOS CALLOS	92
4.3.1. Desarrollo de los callos	92
4.3.2. Aparición de embriones somáticos	96
4.3.3. Características de los embriones somáticos formados	104
4.4. FASE DE REGENERACION DE PLANTAS	107
4.4.1. Formación de nuevos callos y/o embriones	107
4.4.2. Formación de raíces	112
4.4.3. Diferenciación de los embriones somáticos en plántulas	117
4.4.4. Número de plántulas formadas a partir de los embriones somáticos	122
4.4.5. Tiempo de formación de plántulas	128
4.4.6. Características de las plántulas regeneradas a partir de los embriones somáticos	130

4.4.7. Observaciones al microscopio de la formación inicial	130
5. CONCLUSIONES	138
BIBLIOGRAFIA	140
ANEXOS	144

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Tratamientos de fitorreguladores utilizados durante el trabajo preliminar (inducción de callos) sobre dos tipo de explantes (meristemo apical y lámina foliar) provenientes de vitroplantas de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds). Santa Marta, 1998.	46
Tabla 2. Tratamientos de fitorreguladores utilizados en la fase de inducción de callos sobre dos tipos de explantes de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.	49
Tabla 3. Tratamientos de citocininas utilizados en la fase de regeneración de plantas sobre callos embriogénicos de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds). Santa Marta, 1998.	51
Tabla 4. Peso del callo (en gramos) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.	78
Tabla 5. Tiempo de formación de callo (en días) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.	81
Tabla 6. Tasa de crecimiento del callo (en miligramos de callo/día) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.	85
Tabla 7. Tipos de callos formados sobre explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) sometidos a diferentes niveles y tipos de reguladores. Santa Marta, 1998.	91
Tabla 8. Tiempo de aparición (en días) de los primeros embriones	

somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), contados a partir del momento en que se detectó la formación de callo, de acuerdo a la procedencia de los tratamientos de la fase de inducción de callos y al tipo de callo desarrollado. Santa Marta, 1998. 98

Tabla 9. Características de los embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), formados a partir de callos provenientes de explantes tipo meristemo apical sobre un medio de multiplicación de callos, de acuerdo con el tratamiento de procedencia de la fase de inducción de callos. Santa Marta, 1998. 106

Tabla 10. Tipos de respuestas mostradas por los callos embriogénicos (explantes) de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) durante la fase de regeneración de plantas, de acuerdo con los tratamientos evaluados. Santa Marta, 1998. 108

Tabla 11. Número total de embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) que iniciaron su proceso de diferenciación en plántulas, de acuerdo con los tratamientos evaluados en la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998. 123

Tabla 12. Número total de plántulas completas de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) diferenciadas a partir de embriones somáticos, de acuerdo a los diferentes tratamientos evaluados en la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998. 125

Tabla 13. Días de formación de las primeras plántulas completas diferenciadas a partir de embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), de acuerdo a los diferentes tratamientos evaluados en la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998. 129

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Hijuelo de espada de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds), utilizado como fuente de explante para el montaje de la fase de inducción de callos. Santa Marta, 1998.	55
Figura 2. Explante inicial (proveniente de campo) de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds), creciendo en medio MS sin reguladores, a partir del cual se tomaron los explantes definitivos para la fase de inducción de callos. Medida en centímetros. Santa Marta, 1998.	57
Figura 3. Tipos de explantes de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) utilizados en la fase de inducción de callos. Santa Marta, 1998.	59
Figura 4. Callo embriogénico de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds), mostrando desarrollo de embriones somáticos sobre su superficie, utilizado como explante en la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998.	63
Figura 5. Explante tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) creciendo en medio de inducción de callos, mostrando el hinchamiento inicial y señales de una leve oxidación. Santa Marta, 1998.	73
Figura 6. Explante tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) creciendo en medio de inducción de callos, mostrando niveles severos de oxidación. Santa Marta, 1998.	74
Figura 7. Explante tipo zona meristemática o base del corno de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds), creciendo en medio de inducción de callos y mostrando el hinchamiento inicial y presencia de oxidación. Santa Marta, 1998.	76

Figura 8. Callo tipo I, de características ideales para estudios de embriogénesis somática, producido sobre explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) bajo el efecto de reguladores de crecimiento durante la fase de inducción de callos. Santa Marta, 1998. 88

Figura 9. Diferenciación celular de callos (emisión de raíces) de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) en el medio de multiplicación de callos (MS + 1.0 mg/l 2,4-D + 40 mg/l de cisteína + 1.0 g/l de carbón activado). Santa Marta, 1998. 95

Figura 10. Diferenciación celular de callos (producción de embriones somáticos) de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) en el medio de multiplicación de callos (MS + 1.0 mg/l 2,4-D + 40 mg/l de cisteína + 1.0 g/l de carbón activado). Obsérvese la abundante producción de embriones en diferentes estados de crecimiento. Santa Marta, 1998. 100

Figura 11. Callo de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) proveniente de explantes tipo meristemo apical mostrando niveles altos de oxidación y crecimiento de embriones somáticos en la parte más externa. Santa Marta, 1998. 102

Figura 12. Diferenciación celular de callos (producción simultánea de embriones somáticos y raíces) de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) en el medio de multiplicación de callos (MS + 1.0 mg/l 2,4-D + 40 mg/l de cisteína + 1.0 g/l de carbón activado). Santa Marta, 1998. 103

Figura 13. Observación al estereoscopio de embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando la coloración y la superficie irregular que los caracteriza. Santa Marta, 1998. 105

Figura 14. Callo embriogénico de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando la producción de más callo a partir del existente y la oxidación polifenólica que afectó el crecimiento de los embriones somáticos durante la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998. 109

- Figura 15. Callo embriogénico de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando la formación de embriones somáticos (adicionales a los inicialmente sembrados) durante la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998. 111
- Figura 16. Producción de raíces sobre callos embriogénicos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) durante la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998. 113
- Figura 17. Embrión somático de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando el crecimiento exagerado de la raíz y el poco crecimiento de la plúmula. Santa Marta, 1998. 115
- Figura 18. Embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando la emisión de raíces y ningún crecimiento de la plúmula durante la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998. 116
- Figura 19. Numerosos embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) creciendo sobre callo embriogénico con altos niveles de oxidación polifenólica y mostrando el inicio del proceso de diferenciación en plántulas. Santa Marta, 1998. 119
- Figura 20. Embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) iniciando el proceso de diferenciación en plántulas creciendo sobre callo embriogénico que muestra señales de oxidación polifenólica y muerte de algunos embriones. Santa Marta, 1998. 120
- Figura 21. Abundantes embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) en diferentes estados de crecimiento sobre medio de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998. 121
- Figura 22. Embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) en proceso de diferenciación en plántulas mostrando la forma y coloración características de esta etapa del crecimiento. Santa Marta, 1998. 131
- Figura 23. Embrión somático de plátano hartón (*Musa* AAB

Simmonds), diferenciándose en plántulas mostrando el desarrollo de la plúmula y la formación de raíces. Santa Marta, 1998. 132

Figura 24. Plántula de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) recién formada a partir de un embrión somático. Santa Marta, 1998. 133

Figura 25. Plántulas de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de embriones somáticos, creciendo en un medio MS $\frac{1}{2}$ sin reguladores. Santa Marta, 1998. 134

Figura 26. Vista al microscopio (10X) de un embrión somático de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando la plúmula, la radícula y las conexiones vasculares que lo caracterizan. Santa Marta, 1998. 135

Figura 27. Vista al microscopio (40X) de la parte superior de un embrión somático de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando el tejido meristemático. Santa Marta, 1998. 136

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo A. Constitución del medio de cultivo de Murashige and Skoog (1962)	145
Anexo B. Análisis de varianza para peso del callo (en gramos) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.	146
Anexo C. Prueba de Tukey para peso del callo (en gramos) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.	147
Anexo D. Análisis de varianza para tiempo de formación de callo (en días) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.	148
Anexo E. Prueba de Tukey para tiempo de formación de callo (en días) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.	149
ANEXO F. Análisis de varianza para tasa de crecimiento del callo (en miligramos de callo/día) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.	150
Anexo G. Prueba de Tukey para tasa de crecimiento callo (en miligramos de callo/día) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (<i>Musa</i> AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.	151

RESUMEN

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Magdalena (Santa Marta, Colombia), entre febrero de 1997 y octubre de 1998. El objetivo principal fue lograr la desdiferenciación celular de diferentes tejidos (producción de callo) y la regeneración de plantas de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mediante la vía de la embriogénesis somática. Se evaluó el efecto de diferentes fitohormonas y dosis en la producción de callos y la regeneración de plantas completas.

La investigación se realizó en tres etapas (dos experimentos básicos y una fase intermedia), durante las cuales se mantuvo un fotoperíodo de 12 horas y una temperatura promedio de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

En la fase de inducción de callos (fase 1) se utilizó un diseño en parcelas divididas completamente al azar con 2 factores (tipos de explantes y dosis de reguladores) y 3 repeticiones. Se trabajó con dos tipos de explantes procedentes de campo (meristemo apical y zona meristemática) obtenidos de hijuelos de espada seleccionados, los cuales se sometieron a diferentes dosis de 2,4-D (0.5 ; 1.0 y 1.5 mg/l), dicamba (3.0 ; 4.0 y 5.0 mg/l) y las combinaciones 0.5 mg/l de BAP + 1.0 mg/l de 2,4-D y 0.5 mg/l de BAP + 4.0 mg/l de dicamba.

Durante la fase de multiplicación de callos (fase 2) se subcultivaron los callos en un medio de multiplicación de callos (MS + 1.0 mg/l de 2,4-D + 40 mg/l de cisteína + 1 g/l de carbón activado) para aumentar la cantidad de callo disponible para la tercera fase.

En la fase de regeneración de plantas (fase 3) se utilizó un diseño en parcelas divididas, con 4 repeticiones y 3 factores: concentración de sales del MS (completo y a la mitad), dosis de auxina (0.0 y 1.0 mg/l de ANA) y tratamientos de citocininas (BAP y Kinetina, cada una en dosis de 0.5 ; 1.0 y 1.5 mg/l). Como explantes se tomaron callos embriogénicos seleccionados provenientes de la fase de multiplicación.

Los resultados indican que utilizando el meristemo apical como explante se produjo la desdiferenciación de los tejidos en todos los casos, mientras que el otro tipo de explante mostró respuesta negativa. Las dos auxinas evaluadas indujeron la producción de callo y al utilizar las dosis más altas dicha producción fue menor y por lo general se inició más tarde. En general, la auxina 2,4-D fue más efectiva que el dicamba y una dosis de 0.5 mg/l de 2,4-D fue suficiente y efectiva para lograr una buena producción de callo, registrando el mayor peso de callo (0.801 g). El menor peso registrado fue de 0.093 g para una dosis de 5.0 mg/l de Dicamba. La combinación BAP/auxina produjo un ligero incremento en la cantidad de callo y tuvo un efecto benéfico sobre la calidad del callo.

Los primeros callos se obtuvieron aproximadamente al mes de la siembra y los

últimos a los 2 meses. Se logró identificar 3 tipos de callos (I, II y III), diferenciados básicamente por su consistencia, friabilidad, coloración y crecimiento. El desarrollo de estos callos fue afectado, entre otros, por la acción de los fitorreguladores, el número y frecuencia de subcultivos y la oxidación polifenólica, de manera que los diferentes callos formados presentaron tasas de crecimiento distintas. Utilizando 3.0 mg/l de dicamba se produjo el inicio de la callogénesis en forma más rápida, sin embargo, su tasa de crecimiento fue baja. El tratamiento donde se usó 4.0 mg/l de dicamba + 0.5 mg/l de BAP, aún cuando inició callogénesis tarde, mostró la mayor tasa de crecimiento, y la menor se obtuvo con 5.0 mg/l de dicamba. Se notó una gran tendencia de los callos a la emisión de raíces.

La formación de estructuras embriogénicas se detectó generalmente en el medio de multiplicación de callos en un rango de 1 a 4 meses después de iniciada la callogénesis.

Una vez transferidos a los correspondientes medios de regeneración, los callos embriogénicos mostraron tendencia a continuar produciendo más callos y/o embriones y a la formación de raíces. Se obtuvo diferenciación de los embriones somáticos en plántulas, aunque en muy baja proporción (un total de 70 plantas en todo el ensayo), pues aunque el número sembrado fue alto, algunos experimentaron detención del crecimiento y un oscurecimiento severo que impidió su completa diferenciación en plántulas, mostrando posibles deficiencias en la composición del medio básico para esta fase. El BAP tuvo un mejor comportamiento que la kinetina y en general, el medio MS^{1/2} permitió

una mejor regeneración de plántulas. Bajo las condiciones del experimento, fue posible obtener plántulas completas en un tiempo de 72 días después de la siembra de los embriones en el medio de regeneración.

Este estudio debe continuarse para lograr afinar las dosis de los fitorreguladores hasta lograr una mayor y más uniforme germinación de los embriones y mejor conversión en plántulas.

INTRODUCCION

Entre las especies vegetales cultivadas, el plátano (*Musa* AAB Simmonds) es una de las de mayor importancia socioeconómica, especialmente en la alimentación humana, y en las últimas décadas ha adquirido un gran auge en los mercados internacionales.

En la Costa Atlántica, el clon Hartón es el que se cultiva predominantemente y su área sembrada (aproximadamente 1810 hectáreas en 1997) se ha incrementado en los últimos años, generando una creciente demanda por semilla y por tecnologías más adecuadas para su producción.

Ante esta situación, el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* ha jugado un papel importante en el desarrollo de las zonas productoras al permitir una micropropagación masiva de esta especie (a través del cultivo de meristemos), obteniéndose material libre de patógenos para establecer plantaciones sanas y evitar así la diseminación de enfermedades.

Los avances en la biotecnología vegetal y la gran cantidad de investigaciones en este campo han permitido desarrollar nuevas técnicas que podrían mejorar los actuales niveles de producción de las especies cultivadas como el plátano.

Entre estas técnicas merece especial mención la propagación de plantas vía

embriogénesis somática que, además de su potencial para incrementar la micropropagación, permite la realización de estudios bioquímicos y fisiológicos a nivel celular y molecular, constituyéndose en una valiosa herramienta en los estudios de mejoramiento del plátano hacia la búsqueda de materiales que, además de poseer características de un racimo de calidad y buenos niveles de producción, posean resistencia a factores adversos al cultivo, especialmente a las enfermedades y plagas de tipo limitante que han arrasados grandes áreas cultivadoras de plátano y banano en el mundo.

En la búsqueda de metodologías más eficientes de micropropagación que faciliten el desarrollo, producción, mejoramiento y el intercambio de germoplasma de esta especie se planteó la presente investigación con el objetivo de lograr la desdiferenciación celular en una variedad de plátano de adaptación comercial, el plátano hartón, y la posterior regeneración de plantas completas mediante la vía de la embriogénesis somática. Para lograrlo, se establecieron tres etapas dentro de la investigación en las cuales se evaluó el efecto de diferentes dosis y tipos de reguladores en la inducción de callos sobre dos tipos de explantes provenientes de campo (fase de inducción de callos), el desarrollo de los callos hasta la aparición de los embriones somáticos (fase de multiplicación de callos) y el efecto de modificaciones del medio de cultivo suplementado con fitorreguladores en la regeneración de plantas a partir de los embriones somáticos.

2. ANTECEDENTES

2.1. GENERALIDADES

La biotecnología de las plantas ha proporcionado los métodos para producir de forma vegetativa un gran número de clones por técnicas de micropropagación, las cuales permiten obtener materiales libres de enfermedades y regenerar plantas híbridas a partir de embriones que de otra forma serían abortados. (Trujillo y García, 1996, 12).

En el pasado, los brotes meristemáticos (puntos de crecimiento axilares y apicales) han sido ampliamente utilizados como una fuente de explantes para la multiplicación y regeneración *in vitro* del banano y plátano. En estos meristemas, sin embargo, se forman solo unos cuantos brotes con relación al número de células potencialmente capaces de realizar organogénesis.

En la actualidad, el sistema de propagación por la vía de organogénesis directa limita la capacidad de los laboratorios a 8 plántulas por meristemo en promedio.

Desde el punto de vista de la propagación, la embriogénesis somática es el sistema mas eficiente, si se considera la eficiencia como el número de plantas regeneradas por unidad de tiempo. Empleando este sistema se pueden obtener

cantidades casi virtualmente ilimitadas de plantas. (Villalobos y Thorpe, 1993, 135).

La mayoría de la musáceas comestibles son triploides partenocárpicas y por lo tanto su multiplicación es asexual. La baja variación genética, debido a la condición partenocárpica, dificulta su mejoramiento por vías convencionales. En la investigación para la búsqueda de cultivares de plátano y banano resistentes o tolerantes a la sigatoka negra, la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos es de especial interés.

Así, procesos como la embriogénesis somática, la inducción de brotes adventicios y el cultivo de células son de gran utilidad debido a la variabilidad que esto podría generar en la producción de variantes somaclonales y gametoclonales. (Trujillo y García, 1996, 12).

La inducción de embriogénesis somática *in vitro* se ha visto como un sistema más fácilmente manipulable para hacer estudios que permitan determinar los eventos bioquímicos y genéticos que ocurren durante el proceso. (Universidad Central de Venezuela, 1995, 14).

Estos sistemas de cultivo abren nuevas posibilidades para manipulaciones genéticas en bananos y plátanos y son apropiados para crear nuevas variedades genéticas. (Novak et al, 1991, 102).

El estudio de los procesos implicados en la embriogénesis somática es un paso necesario para lograr una verdadera regeneración masiva *in vitro*. El desarrollo

de embriones somáticos abre nuevas perspectivas a la tecnología de semillas artificiales en bananos y plátanos como una metodología alterna para la propagación en el futuro.

Existen dificultades en el establecimiento de todas esas técnicas. Sin embargo, algunos resultados ya han sido reportados, especialmente en especies silvestres, pero existe la necesidad de llevar estas técnicas a especies o variedades cultivadas y de adaptación regional.

2.2. CALLOGENESIS

La producción de callo ha tenido importancia en la investigación de la fisiología vegetal, organogénesis, embriogénesis, genética, fisiología y estudios de estructura celular, así como en la propagación de plantas. Actualmente se da énfasis al área de síntesis y extracción de productos naturales tales como los fármacos. (Bermúdez y León, 1994, 54).

El callo es un tejido coherente pero no organizado y amorfo formado por la división vigorosa de las células vegetales. (George y Sherrington, 1984, 17). Este tejido es obtenido por medio del aislamiento del órgano o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular. (Butcher e Ingran, citados por Hurtado y Meriño, 1980, 94).

El callo frecuentemente es inducido en o sobre partes de una planta intacta mediante heridas, por la presencia de insectos o microorganismos, o como resultado del estrés. (George y Sherrington, 17).

De acuerdo con Yeoman y Macleod (citados por Hurtado y Meriño), la inducción de callo a partir de una porción vegetal sucede cuando el inóculo ya estéril se pone en contacto con un medio de cultivo que induzca y mantenga un crecimiento y una división celular continua. (1980, 95)

El tejido de muchos órganos puede tener un potencial último para dividirse y proliferar cuando se transfiere a un medio de cultivo, pero en la mayoría de las plantas los tejidos de algunos órganos están más predispuestos a la rápida división celular que otros. Aún tejidos estrechamente asociados dentro de un órgano pueden tener diferentes potenciales. (George y Sherrington, 1984, 17).

Precisamente, para tener éxito en la producción de callo hay que tener en cuenta ciertos factores que afectan dicho proceso.

Durzán (citado por Sandoval y Muller), afirmó que entre los factores a tomar en cuenta para lograr el éxito en un cultivo se consideran: fuente, tamaño, patrón de crecimiento y edad del explante, además de la posición del explante en el medio de cultivo, el microambiente y la totipotencia de las células. (1987, 89).

La elección de un explante adecuado es el primer paso para establecer un cultivo, siendo factible la utilización de una amplia gama de explantes que, cultivados en condiciones apropiadas, permitan la proliferación callosa. Sin embargo, esta elección se complica si se pretende obtener plantas a partir de callos. (Roca y Mroginski, 1993, 22).



Virtualmente, todos los tejidos vegetales tienen la capacidad de formar callo *in vitro*. Sin embargo, relativamente pocos explantes tienen la habilidad para producir callos embriogénicos. Comúnmente se han usado como explantes partes de plántulas como cotiledones, hipocótilos y embriones; adicionalmente, se han usado ápices caulinares, segmentos de tallo, hojas, raíces, anteras e inflorescencias inmaduras. Es muy frecuente la utilización de ápices o meristemas caulinares. (Litz y Jarret, 1993, 147).

2.3. CARACTERISTICAS DE LOS CALLOS.

Desde el punto de vista morfogénico, la característica más importante del callo es la totipotencialidad de sus células, ya que, en general, con un manejo adecuado de las condiciones nutricionales, hormonales y ambientales, éstas tienen la capacidad de desarrollar brotes, raíces, embriones, etc., los cuales pueden llegar a formar plántulas completas. (Hurtado y Meriño, 1980, 95).

El tejido de callo no es uniforme, contiene células meristemáticas, células parenquimatosas, células altamente vacuoladas, células gigantes elongadas, etc. La heterogeneidad de los callos refleja la morfología del explante original. (Novak, 1988, 59).

Aún el tipo de callo formado de una planta particular y su grado de diferenciación celular y organogénesis depende del tejido del cual se haya obtenido el explante y de los componentes del medio de cultivo y de las condiciones ambientales del cultivo. Los cultivos de callo también pueden

diferir en color y en su capacidad para regenerar nuevas plantas. (George y Sherrington, 1984, 18).

La coloración puede también variar, aún derivando de la misma especie. Se pueden presentar callos que carecen de pigmentación, mientras que otros pueden ser de diferentes tonos de verdes, amarillo, café, o rojo. El tipo y grado de pigmentación está marcadamente influenciado por factores nutricionales y ambientales, y se manifiesta por la presencia de clorofila, carotenos, antocianinas, etc. (Bermúdez y León, 1994, 56).

De esta forma, los callos pueden presentar diferentes tipos morfológicos, los cuales varían según la capacidad externa, textura y composición celular.

Algunos callos son masas compactas y duras, con células íntimamente unidas, mientras otros son esponjosos con una gran cantidad de espacios intercelulares. (Bermúdez y León, 56).

Si las células del explante que se dividen y proliferan son de un solo tipo, estas generalmente dan lugar a un callo relativamente uniforme. Si por el contrario, células de diferentes tipos son las que se dividen hay una tendencia a que después de un tiempo el callo resultante consista de una mezcla de células de diferente constitución genética y/o potencial epigenético. (George y Sherrington, 18).

2.4. EFECTO DE LOS REGULADORES EN LA CALLOGENESIS.

Con el estímulo de sustancias de crecimiento endógenas o de reguladores de crecimiento químico agregados al medio, el metabolismo de la células es cambiado de ser quiescente a ser metabólicamente activo. El proceso de diferenciación y especialización celular que ocurre en la planta intacta puede ser revertido y en este caso se dice que el tejido del explante comienza a desdiferenciarse. (George y Sherrington, 1984, 17).

Según Devlin (citado por Hurtado y Meriño), en el cultivo *in vitro* se requiere de la adición de auxina al medio para la inducción y proliferación de callo. La producción de este agregado celular está íntimamente relacionada con la concentración y el tipo de auxina empleada. (1980, 53).

Las auxinas, principalmente el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), son ampliamente usadas en trabajos de callogénesis, debido a que, entre otros muchos efectos (alargamiento y multiplicación celular, formación de brotes, raíces y tejido calloso, respiración, abscisión, partenocarpia, dominancia apical y embriogénesis), suprimen la morfogénesis y dan por resultado la rápida proliferación de células tipo callo. (Sharp et al., citados por Hurtado y Meriño, 53).

La respuesta a la inducción de callo varía de especie a especie, encontrándose así tejidos en los que para inducir callo es requisito el suplemento de una auxina o un regulador de crecimiento relacionado; otros requieren solo una citocinina o un suplemento tanto de auxina como de citocinina, o bien, solo

responden en presencia de extractos de complejos naturales en el medio, encontrándose para cada especie una auxina o un regulador de crecimiento y una concentración óptima para la inducción y mantenimiento del callo. (Hurtado y Meriño, 96).

Por su parte, las citocininas tienen un intervalo amplio de efectos regulatorios, promueven la multiplicación celular, generalmente inhiben el crecimiento de raíces y la elongación del tallo, pero estimulan el alargamiento de las hojas, promueven el crecimiento de yemas dormantes, actúan en el retraso de la senescencia, en el rompimiento de la dominancia apical y tiene un papel fundamental en la organogénesis, ya que induce la formación de yemas en el cultivo *in vitro* de callos, hojas, raíces, cotiledones o porciones de tallo; promueven la división celular y la organización de los callos. (Bermúdez y León, 1994, 59).

2.5. CALLOGENESIS EN BANANO Y PLATANO.

La inducción de callo en banano y plátano ha sido realizada a partir de múltiples partes de la planta (embriones de semillas diploides, secciones de inflorescencias, secciones de frutos, ápices florales, la base de las hojas, microcormos de vitroplantas y a partir del cultivo *in vitro* de ápices vegetativos, entre otros). (Gómez et al., 1995, 233).

Sandoval y Tapia (citados por Escalante, Tapia y Sandoval), estimularon la formación de callo a partir de segmentos de cormos de plántulas *in vitro*,

cultivados en un medio sólido de Schenck y Hildebrandt suplementado con 6.0 mg/l de dicamba (ácido 3,6-dicloro-metobenzoico). (1991, 39).

Liu et al. indujeron la formación de callo trabajando con 6 cultivares de plátano (enano común, congo enano, maricongo, congo, clon 12 y clon 7), suplementando el medio basal de Murashige y Skoog (medio MS) con 0.005 mg/l de 2,4-D, 0.1 mg/l de ácido 1-naftalenacético (ANA), 0.5 mg/l de 6-benzilaminopurina (BAP), 15% de agua de coco (v/v) y 20.0 mg/l de ácido ascórbico. (1989, 53).

Novak et al. iniciaron callos embriogénicos a partir de tejidos de la vaina de la base de las hojas y del rizoma de plátano y banano sobre el medio de Schenk y Hildebrant (medio SH) suplementado con 30 μ M de dicamba. (1990, 6).

Pons trabajó en anteras de *Musa* sp. en la formación de callos, utilizando como fitorreguladores dicamba y 2,4-D en concentraciones de 0.0, 2.0, 4.0, 5.0, 8.0 y 10.0 μ M, en combinación con 0.0 y 2.0 μ M de kinetina (N^6 furfuriladenina) o bien de 2ip (N^6 - isopentenil adenina). En menos de dos meses se formaron callos pequeños, bicolor amarillo-blancuzco, en las combinaciones suplementadas con el fitorregulador dicamba. Los fitorreguladores de crecimiento se mostraron ineficientes en dosis inferiores a 2.0 μ M e inhibidores para valores superiores a 10.0 μ M. (1990, 5).

Marroquín et al. lograron obtener callos embriogénicos a partir de embriones zigóticos inmaduros (de 45 días de edad) de plantas autopolinizadas de *Musa acuminata* subespecie *malaccensis*. Estos embriones fueron cultivados en un

medio semisólido que consistía de las sales de MS con los macroelementos a la mitad de la concentración, suplementado con 1.47 mM de KH_2PO_4 más las vitaminas de Morel, 175 mM de sucrosa y 7.5 μM de picloram (ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico). Los cultivos se mantuvieron durante 3 meses sin subcultivarlos. (1993, 43).

En un trabajo realizado por Okole y Schulz se reportó la inducción de callos (aproximadamente en un mes) utilizando el método de microsecciones transversales cultivadas en la oscuridad en un medio constituido por las sales de Gamborg (medio B-5), 2.45 g/l de phytigel, 30 g/l de sucrosa y una mezcla especial de vitaminas y aminoácidos. Como reguladores utilizaron 10 μM de dicamba y 1 μM de ácido 1-indolacético (AIA). (1996, 186)

Gómez *et al.*, trabajando con varios genotipos de plátano y banano (del grupo AAA los clones parecido al rey, gran enano y UCRS; del grupo AAB el clon Cemsa $\frac{3}{4}$; del grupo ABB el clon burro Cemsa), obtuvieron callos proembriogénicos usando como explante la base de las hojas de plantas cultivadas *in vitro* y rizomas de plantas de campo de 5 a 6 meses de edad. Los callos los obtuvieron en un medio SH modificado suplementado con 4.56 mg/l de dicamba. (1995, 235).

Bieberach, utilizando flores masculinas como explantes, logró la inducción de callos friables e inducción de cultivos embriogénicos en los cultivares Gross Michel y Dominico utilizando el medio MS más 30 g/l de sucrosa y 1.0 a 2.0 mg/l de 2,4-D, y en el híbrido EMBRAPA-403 (AAAB) usando 30 g/l de sucrosa más 4 mg/l de 2,4-D. También logró obtener cultivo de callos friables

en los cultivares Gran enano y Gross Michel utilizando zeatina (4-hidroxi-3-metil-trans-2-butenilamino purina) en concentraciones de 0.2 y 1.0 mg/l. (1995, 16).

2.6. LA EMBRIOGENESIS SOMATICA.

La embriogénesis somática es el proceso por el cual células somáticas diploides o germinativas haploides se diferencian hasta formar un embrión, sin que haya fusión de gametos. Un embrión somático puede definirse como una planta en su etapa inicial de desarrollo que presenta una estructura bipolar, con raíz y vástago en polos opuestos de un mismo eje, no tiene conexión vascular con los tejidos maternos y su origen es unicelular o multicelular pero las células que lo originan no son el producto de la fusión gamética. (Litz y Jarret, 1993, 144; Universidad Central de Venezuela, 1995, 13).

De acuerdo con Williams y Maheswaran, la embriogénesis somática es una vía para inducir la regeneración de cultivos de tejidos *in vitro*, ocurriendo ya sea indirectamente de callos, suspensiones o cultivo de protoplastos, o directamente de células de una estructura organizada tales como un segmento del tallo o un embrión zigótico. (1986, 443).

Se puede establecer entonces que la embriogénesis somática puede ser directa si los embriones se originan directamente de un tejido sin que haya previamente proliferación de callo, e indirecta cuando la proliferación de callo es un requisito previo para el desarrollo del embrión. (Universidad Central de Venezuela, 14).

Una hipótesis elaborada por Evans *et al.* (citados por Williams y Maheswaran), sugiere que la embriogénesis directa se da a partir de células que están determinadas para un desarrollo embriogénico antes de tomar el explante, requiriendo solo reguladores de crecimiento o condiciones favorables para entrar en división celular y lograr la expresión de la embriogénesis. Por el contrario, la embriogénesis indirecta requiere la determinación de células diferenciadas, proliferación de callo y el desarrollo del estado determinado embriogénicamente. Para la inducción de las células determinadas embriogénicamente los reguladores de crecimiento se requieren no solo para volver a entrar en mitosis sino también para la determinación del estado embriogénico. (1986, 444).

En todos los sistemas las células embriogénicas a partir de las cuales se derivan visiblemente los embrioides muestran un número de características comunes, las cuales corresponden a las características de las células meristemáticas de rápida división. Estas incluyen: tamaño pequeño, contenidos citoplásmicos densos, grandes núcleos con nucleolos alargados prominentes, vacuolas pequeñas y una profusión de granos de almidón. (Williams y Maheswaran, 443).

2.7. EFECTO DE LOS REGULADORES EN LA EMBRIOGENESIS SOMATICA.

Aparentemente, los factores químicos más importantes para la embriogénesis somática son las auxinas exógenas, la fuente y la concentración del nitrógeno y algunas otras sustancias como la sacarosa. (Villalobos y Thorpe, 1993, 135).

Para obtener embriones somáticos generalmente se ha usado el medio MS o la modificación de esta formulación, ya que la concentración alta de sales de este medio parece ser muy benéfica para el crecimiento de los embriones somáticos. (Ammirato, 1983, 98).

Sin embargo, la respuesta embriogénica del callo depende del genotipo de la planta. Algunos cultivares se pueden regenerar fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden al mismo medio. (Litz y Jarret, 1993, 148).

Según Litz y Jarret, se necesita la presencia de una auxina para la iniciación de un callo embriogénico. Usualmente se usa el 2,4-D, el cual aparentemente brinda el estímulo para la iniciación de la embriogénesis somática en el callo. Sin embargo, la maduración de los embriones y la germinación no ocurre en presencia de 2,4-D; en consecuencia, hay que remover la auxina o usarla en concentraciones más bajas. (146).

Lozoya afirma que, en términos generales, los embriones somáticos surgen a partir de callos y cuando estos se transfieren a un medio sin auxina, con carbón activado o altas concentraciones de nitrógeno y potasio. Con frecuencia se señala la adición de sustancias al medio para favorecer la embriogénesis (tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, glicina, mesoinositol, adenina, adenosina, etc.). (s.f., 55).

De acuerdo con Novak et al, el desarrollo embriogénico depende de la presencia de auxinas utilizadas como reguladores de crecimiento adicionadas

en el medio básico. Diferentes auxinas fueron estudiadas en el laboratorio y se encontró que el dicamba resultó ser el factor más efectivo para la proliferación de embriones globulares sobre la superficie del explante. (1991, 101).

El papel de las citocininas en el medio primario o inductor del embrión es el menos claro, aunque normalmente el medio incluye una de ellas. Fujimura et al. (citados por Litz y Jarret), sugieren que las citocininas pueden ser esenciales para la maduración y la germinación de los embriones somáticos. (1993, 150).

2.8. EMBRIOGENESIS SOMATICA Y REGENERACION DE PLANTAS EN BANANO Y PLATANO.

En musáceas se ha logrado la formación de embriones somáticos en algunos clones diploides y triploides. (Perea, 1995, 61).

Cronauer y Krikorian (citados por Krikorian), obtuvieron embriones somáticos de dos clones triploides (ABB) de plátano (Saba y Pelipita) a partir de suspensiones celulares, utilizando el medio MS suplementado con 1.0 mg/l de 2,4-D y 1.0 mg/l de 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético) y con la citocinina BAP (dosis entre 0.1 y 1.0 mg/l). Se formaron masas proembriónicas y, en el caso de los tratamientos que contenían 2,4,5-T, hubo formación de embriones somáticos.. También obtuvieron respuestas en el llamado "Horn plantain". (1986, 130).

Escalant y Teisson lograron obtener embriones somáticos a partir de embriones zigóticos inmaduros en especies diploides de *Musa*. (1989, 667).

El primer reporte sobre la exitosa regeneración de plantas a partir de embriones somáticos obtenidos de suspensiones celulares fue realizado a partir de callos obtenidos de la base de las hojas de plantas cultivadas *in vitro* y de plantas de campo, utilizando el medio SH modificado suplementado con 30 μM de dicamba. (Novak et al., 1989, 101).

En el trabajo de Marroquín et al., los callos obtenidos fueron transferidos, después de tres meses, a un medio con los macroelementos completos más 126 mM de sucrosa y 3.25 μM de picloram, realizando los subcultivos posteriores mensuales en el mismo medio. (1993, 43).

Estos investigadores lograron la regeneración de las plantas por dos métodos: En el primer método, los embriones somáticos fueron aislados por filtrado de las suspensiones celulares y luego fueron transferidos a un medio semisólido sin picloram pero suplementado con 0.22 μM de BAP y 1.14 μM de AIA, en donde se produjo su germinación. En el segundo método, inocularon alícuotas de las suspensiones celulares filtradas sobre un medio semisólido sin hormonas. Después de la diferenciación de los embriones somáticos, la germinación ocurrió luego de transferirlos al mismo medio anterior pero suplementado con BAP (0.22 μM) y AIA (1.14 μM). (1993, 43).

En el trabajo de Okole y Schulz, después de transferir los callos a un medio libre de fitohormonas comenzaron a producirse estructuras similares a embriones somáticos que fueron removidos del tejido calloso y transferidos a un medio de Nitsch y Nitsch suplementado con 1.0 μM de BAP y 0.5 μM de AIA, donde se produjo la regeneración de plántulas. (1996, 186).

Gómez et al. lograron la regeneración de plantas en un medio compuesto por el 50% de las sales MS suplementado con 2% de sacarosa, 40 mg/l de cisteína, 1.0 g/l de carbón activado, 100 mg/l de mioinositol, 1.56 mg/l de zeatina, y la mezcla de vitaminas de Berg y Bustamante sin la cianocobalamina. (1995, 244).

Recientemente, Harran y Rosignol (citados por Perea), lograron la formación de embriones somáticos y la regeneración de plantas a partir de inflorescencias en el clon Gran enano (AAA). (1995, 62).

Dhed'a et al. establecieron cultivos embriogénicos en suspensión, con potencial para la regeneración en plántulas vía embriogénesis directa, partiendo de tejido somático (meristemas en etapa de proliferación *in vitro*). (1991, 133).

Bieberach estudió el proceso de embriogénesis somática en 4 cultivares de *Musa* (Gross Michel y Gran enano, del grupo 'AAA'; el híbrido EMBRAPA-403 'AAAB'; y el plátano Dominicano 'AAB') y logró establecer suspensiones celulares en los cultivares triploides. Sin embargo, la formación de embriones somáticos se detectó solo 4 y 6 meses después del cultivo para los clones Gran enano y Dominicano, respectivamente, presentándose la germinación de estos embriones en un porcentaje muy bajo para el clon Dominicano. (1995, 16).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. LOCALIZACION

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Magdalena, localizado en el municipio de Santa Marta, departamento del Magdalena, Colombia, con coordenadas $74^{\circ}07'$ y $74^{\circ}12'$ de longitud oeste y $11^{\circ}11'$ y $11^{\circ}15'$ de latitud norte.

El trabajo se desarrolló entre Febrero de 1997 y Octubre de 1998.

3.2. FASES DE LA INVESTIGACION

La investigación se realizó en tres etapas, comprendiendo dos experimentos básicos y una fase intermedia. Las etapas fueron las siguientes:

3.2.1. Fase de inducción de callos.

3.2.2. Fase de multiplicación de callos (etapa intermedia).

3.2.3. Fase de regeneración de plantas.

Adicional a este experimento central que incluía las tres fases ya citadas se

realizó un trabajo preliminar sobre callogénesis con material proveniente de vitroplantas de plátano hartón.

3.3. TRABAJO PRELIMINAR PARA OBTENCION DE CALLO CON VITROPLANTAS.

Siendo uno de los objetivos del trabajo evaluar el comportamiento de varios tipos de explantes sometidos al efecto de distintas dosis y/o tipos de reguladores de crecimiento, adicionalmente al trabajo central correspondiente a la presente investigación se reportan la metodología y resultados de un trabajo realizado a manera de estudio preliminar, en el cual se pretendió evaluar el comportamiento de varios tipos de explantes (lámina foliar y meristemo) provenientes de material de plátano hartón cultivado *in vitro*, sometidos a diferentes dosis de reguladores para lograr la inducción de callos sobre dichos explantes. Los resultados de este estudio preliminar fueron de gran utilidad para el planteamiento del trabajo definitivo y para realizar un mejor análisis de los resultados.

3.3.1. Montaje del trabajo preliminar con vitroplantas. Este trabajo preliminar se montó como un diseño en parcelas divididas en bloques al azar con dos factores (dosis de reguladores y tipo de explante) y 4 repeticiones. Las parcelas grandes correspondían a los tipos de explantes a evaluar (lámina foliar y meristemo). Las parcelas pequeñas estaban constituidas por los distintos tratamientos de fitorreguladores que se enuncian en la tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos de fitorreguladores utilizados durante el trabajo preliminar (inducción de callos) sobre dos tipos de explantes (meristemo apical y lámina foliar) provenientes de vitroplantas de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds). Santa Marta, 1998.

TRATAMIENTO	DOSIS
a	0.5 mg/l 2,4-D
b	1.0 mg/l 2,4-D
c	1.5 mg/l 2,4-D
d	2.0 mg/l 2,4-D
e	3.0 mg/l Dicamba
f	4.0 mg/l Dicamba
g	5.0 mg/l Dicamba
h	0.5 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l BAP
i	1.0 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l BAP
j	1.5 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l BAP
k	2.0 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l BAP
l	3.0 mg/l Dicamba + 0.5 mg/l BAP
m	4.0 mg/l Dicamba + 0.5 mg/l BAP
n	5.0 mg/l Dicamba + 0.5 mg/l BAP

3.3.2. Selección de los explantes y siembra en medio de inducción de callos. Los explantes fueron tomados de material vegetal *in vitro* provenientes del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Magdalena.

Los explantes tipo lámina foliar se tomaron a partir de vitroplantas que crecían en un medio de enraizamiento *in vitro* para plátano (MS sin fitorreguladores) y que tuvieran por lo menos 2-3 hojas formadas y expandidas. En condiciones asépticas (cámara de flujo laminar) las vitroplantas se sacaron de los frascos que las contenían y se colocaron sobre un papel estéril en una caja petri. Utilizando pinzas y bisturíes estériles se procedió a cortar las hojas más desarrolladas de la vitroplanta. De cada hoja cortada se tomó una sección de aproximadamente 2 cm de largo incluyendo una parte de la vaina de la hoja y otra de la lámina. En dos bloques del ensayo se sembraron los explantes así cortados en los diferentes medios a evaluar. Para los restantes dos bloques se tomaron explantes cortados en la forma ya descrita, pero esta vez se dividió cada sección por la mitad, a lo largo de la nervadura central de la hoja. Cada una de las mitades restantes correspondía a un explante, el cual se sembraba en el medio de inducción de callos respectivo.

Los explantes tipo meristemo se tomaron a partir de material *in vitro* que venía creciendo en un medio de proliferación de brotes para plátano (MS + 4 mg/l de BAP + 40 mg/l de cisteína), y que mostraban gran cantidad de brotes. En condiciones asépticas se tomaron los grupos de brotes, se sacaron de los frascos y se colocaron sobre papel estéril y se procedió a desprender cuidadosamente cada brote. Se seleccionaron brotes de tamaño similares con

los cuales se inocularon los medios respectivos dentro de un bloque. En otro bloque se tomaron explantes iguales pero se cortaban por todo el centro procurando que le quedara igual cantidad de tejido meristemático a ambas partes. Estas mitades representaban los explantes a inocular en los medios. En los restantes dos bloques se tomaron protocormos que crecían en forma de bolas compactas. Este material se dividió en secciones de aproximadamente 1 cm² de superficie y 5 mm de espesor, descartando las partes más externas. Cada una de estas secciones constituía un explante.

Una vez seleccionados y sembrados los respectivos explantes se llevaron al cuarto de crecimiento a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperíodo de 12 horas.

Se hizo el seguimiento de este ensayo y se realizaron las observaciones respectivas para detectar la formación de callo.

3.4. DISEÑO EXPERIMENTAL DE LA INVESTIGACION

3.4.1. En la fase de inducción de los callos. Para esta fase se utilizó un diseño en parcelas divididas completamente al azar, con tres repeticiones, en donde las parcelas grandes correspondieron a los dos tipos de explantes evaluados (meristemas y zona meristemática o base del cormo) y las subparcelas correspondieron a los diferentes tratamientos (8 dosis) de los fitorreguladores a utilizar (tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos de fitorreguladores utilizados en la fase de inducción de callos sobre dos tipos de explantes de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.

TRATAMIENTO	DOSIS
a	0.5 mg/l 2,4-D
b	1.0 mg/l 2,4-D
c	1.5 mg/l 2,4-D
d	3.0 mg/l Dicamba
e	4.0 mg/l Dicamba
f	5.0 mg/l Dicamba
g	1.0 mg/l 2,4-D+ 0.5 mg/l BAP
h	4.0 mg/l Dicamba + 0.5 mg/l BAP

3.4.2. En la fase de multiplicación de callos. Por ser esta una fase de transición entre la inducción de callos y la regeneración de plantas, se realizó el seguimiento del desarrollo de los callos para detectar las diferentes respuestas mostradas, manteniendo la procedencia de cada callo de acuerdo al diseño inicial de la fase de inducción de callos y luego se utilizó un medio en común para sincronizar su desarrollo. Esto se hizo con el objetivo inicial de obtener material suficiente para la fase de regeneración de plantas y de uniformizar (en lo posible) los tipos de callos encontrados.

3.4.3. En la fase de regeneración de plantas. El diseño experimental utilizado durante esta fase fue el de parcelas subdivididas en bloques completamente al azar, con 3 factores y 4 repeticiones, en donde las parcelas grandes correspondían a los dos niveles del medio básico de Murashige y Skoog (MS completo y MS a la mitad de la concentración) y las subparcelas correspondieron a la ausencia o presencia de auxina en el medio de cultivo (0.0 y 1.0 mg/l de ANA). Las sub-subparcelas correspondieron a los diferentes tipos y dosis de citoquininas (Tabla 3). El parámetro principal de evaluación de esta fase fue la regeneración de plantas completas en cada uno de los tratamientos, razón por la cual se presentará un análisis cualitativo y comparativo.

3.5. MATERIALES UTILIZADOS

3.5.1. Material vegetal. El material vegetal utilizado para el montaje del trabajo central del cual trata la presente investigación correspondió a hijuelos de espada de plátano de la variedad Hartón (*Musa* AAB Simmonds), los cuales fueron recolectados de cultivos establecidos en la granja del Centro de

Tabla 3. Tratamientos de citocininas utilizados en la fase de regeneración de plantas sobre callos embriogénicos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds). Santa Marta, 1998.

TRATAMIENTO	DOSIS
T1	0.5 mg/l BAP
T2	1.0 mg/l BAP
T3	1.5 mg/l BAP
T4	0.5 mg/l kinetina
T5	1.0 mg/l kinetina
T6	1.5 mg/l kinetina

Investigación CARIBIA de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), localizada en el corregimiento de Sevilla, municipio de Ciénaga, Magdalena, Colombia. Como se mencionó antes, para el trabajo preliminar sobre obtención de callos con vitroplantas se utilizaron vitroplantas de plátano hartón (en estados de multiplicación y enraizamiento *in vitro*) provenientes del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad del Magdalena

3.5.2. Reactivos. Para la preparación de los diferentes medios se utilizaron reactivos analíticos especiales para cultivo de tejidos. Como fuente de carbohidratos se utilizó azúcar refinada comercial. Para los procedimientos de desinfección se utilizó alcohol del 70% y del 96%, detergente, jabón bactericida y blanqueadores comerciales (ingrediente activo : hipoclorito de sodio al 5.25%). Para el montaje de placas se utilizaron la glicerina y los colorantes azul de toluidina y safranina.

3.5.3. Implementos y equipos de laboratorio. Para poder realizar la presente investigación se utilizaron implementos de disección y la vidriería necesaria, además, se utilizaron los siguientes equipos: cámara de flujo laminar, autoclave, balanzas, destilador, desionizador, plancha magnética, potenciómetro, refrigerador, estereoscopio, microscopio, equipo de fotografía.

3.6. DESARROLLO DEL TRABAJO

3.6.1. Preparación de los medios de cultivos. Los medios de cultivo utilizados en las diferentes fases del trabajo experimental tuvieron como base la

formulación desarrollada por Murashige y Skoog en 1962 (Medio MS) (Anexo A), habiéndose modificado la cantidad de tiamina a 0.4 mg/l. De acuerdo a la fase en la que se iban a utilizar los medios, éstos se suplementaban con los respectivos reguladores de crecimiento y antioxidantes.

Los medios se prepararon a partir de las soluciones madres en concentraciones apropiadas para los diferentes compuestos (nutrientes y reguladores de crecimiento), las cuales se preparaban utilizando agua destilada-desionizada y se mantenían en la nevera.

Para preparar los medios se colocó en un beaker agua destilada-desionizada. Luego se añadieron, en su orden, las respectivas cantidades (en mililitros) de las soluciones madres requeridas por los diferentes medios correspondientes a los tratamientos a evaluar. Una vez agregadas todas las soluciones madres se procedió a añadir el azúcar y se aforó al volumen requerido. El pH fue ajustado posteriormente a 5.8 con NaOH 1N y/o HCl 1N para cada uno de los medios. Los medios se calentaron en una plancha magnética con agitación. Una vez calientes, se añadió el Phytigel en las cantidades indicadas según cada tratamiento y se dejó que hirvieran. Finalmente se distribuyeron en frascos de vidrio previamente marcados añadiendo 25 ml por frasco, se taparon y se llevaron al autoclave durante 20 minutos a una temperatura de 121° C y una presión de 15 psi. Cumplido el tiempo los medios se sacaron del autoclave y se dejaron enfriar. Estos medios se mantuvieron en el cuarto aséptico por seis días para verificar su esterilidad.

3.6.2. Selección del material en campo. Se seleccionaron en el campo hijuelos de espada de plátano hartón con una altura entre 50 y 70 centímetros (figura 1), teniendo en cuenta que provinieran de plantas en producción con un buenseudotallo y un buen racimo y que estuvieran sanas.

Los hijuelos fueron arrancados de la planta madre procurando no causarles heridas. Se les retiró la tierra que tenían adherida, se lavaron con abundante agua corriente, se le cortaron las raíces y la parte superior delseudotallo hasta dejarlos con una longitud de 20 cm. Posteriormente se empacaron en sacos plásticos para ser transportados al laboratorio, en donde se realizó la desinfección y la extracción del meristemo.

3.6.3. Desinfección del material vegetal y extracción del meristemo. Los cormos traídos del campo se lavaron con agua corriente y se procedió a rebajar su tamaño con un cuchillo desinfectado, eliminándoles las partes externas del cormo y las vainas foliares hasta dejar secciones de aproximadamente unos 10 cm, las cuales se colocaron en un recipiente con agua corriente y posteriormente se sumergieron en solución de detergente más jabón bactericida durante 10 minutos. Se enjuagaron con agua destilada y se procedió a rebajar su tamaño hasta dejar las secciones de 5 cm.

Una vez hecho esto, los pequeños cormos fueron introducidos en frascos estériles cubiertos con una gasa y se les realizó una primera desinfección con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3% durante 20 minutos (agitándolos



Figura 1. Hijuelo de espada de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), utilizado como fuente de explante para el montaje de la fase de inducción de callos. Santa Marta, 1998.

constantemente), seguida de tres enjuagues con agua destilada estéril de tres minutos cada uno.

Posteriormente, se llevaron a cámara de flujo laminar donde, utilizando pinzas y bisturíes estériles, se les redujo su tamaño a unos 3 cm de largo. Seguidamente se les hizo una segunda desinfección con NaOCl al 1% durante 10 minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (enjuagues de 3 minutos cada uno). Luego se procedió a reducir su tamaño hasta dejar conos de aproximadamente 2 cm de largo los cuales encerraban el meristemo (protegido por los primordios de hoja).

3.6.4. Siembra de explantes en medio en blanco. Los explantes obtenidos (figura 2) se sembraron asépticamente en frascos que contenían 25 ml de medio de Murashige y Skoog sin hormonas (medio en blanco) suplementado con 100 mg/l de mioinositol y 40 mg/l de cisteína y solidificado con 2 g/l de Phytigel. Una vez sembrados, los frascos se sellaron, se marcaron y se llevaron inmediatamente al cuarto de crecimiento durante 20 días a una temperatura de $28 \pm 1^\circ \text{C}$ y un fotoperíodo de 12 horas.

3.6.5 Obtención de explantes para siembra en medios de inducción de callos. Para el montaje del experimento se utilizaron, en la primera fase, dos tipos de explantes : Meristemo apical y zona meristemática o base del corno.

Para la obtención de dichos explantes se tomaron los meristemos apicales que

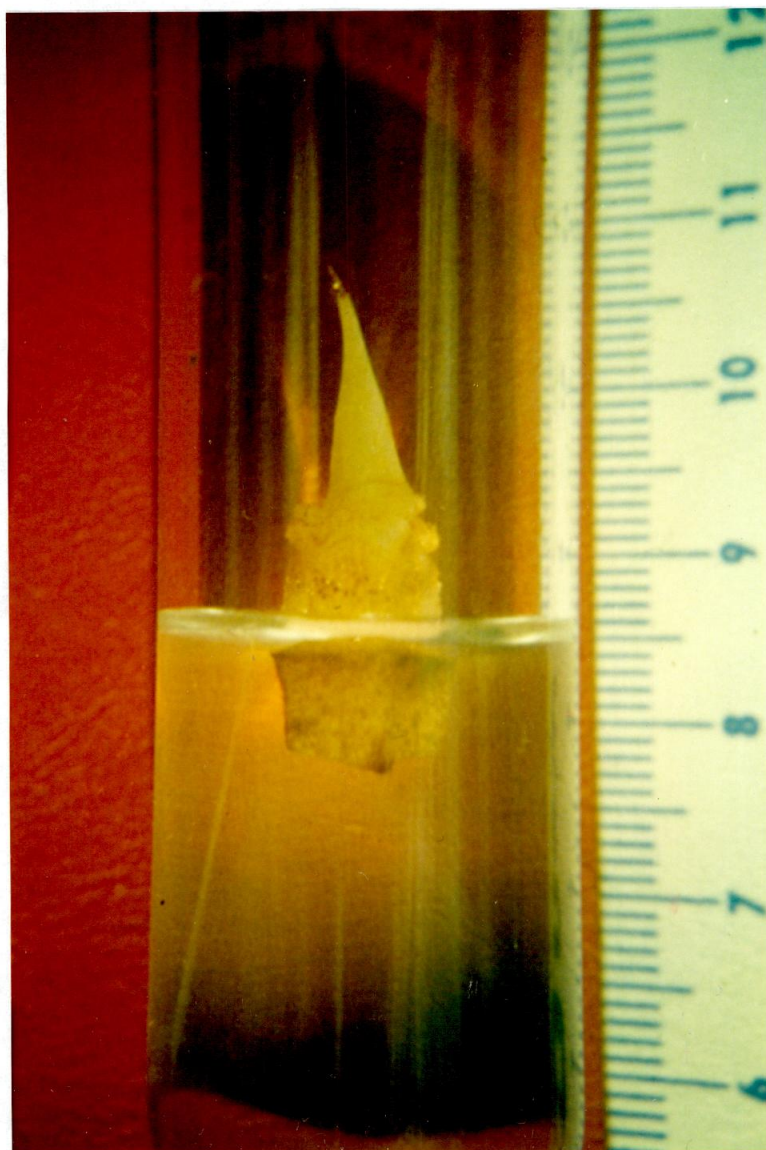


Figura 2. Explante inicial (proveniente de campo) de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), creciendo en medio MS sin reguladores, a partir del cual se tomaron los explantes definitivos para la fase de inducción de callos. Medida en centímetros. Santa Marta, 1998.

llevaban 20 días en el medio básico y que mostraban un buen crecimiento y, trabajando en condiciones asépticas (en cámara de flujo laminar), se les retiró la parte oxidada, luego se dividieron en dos partes procurando que a cada parte le correspondiera igual cantidad de tejido meristemático. Seguidamente se procedió a cortar una porción de la base del cormo, la cual serviría como un tipo de explante. La parte superior que encerraba al meristemo apical correspondía al otro tipo de explante (figura 3).

3.6.6. Siembra de los explantes en medio de inducción de callos. Cada uno de los explantes seleccionados se sembraron en frascos que contenían 25 ml de medio de cultivo semisólido de MS suplementado con cisteína (40 mg/l) y con las diferentes dosis de cada uno de los reguladores (2,4-D ; BAP ; Dicamba) correspondientes a los diferentes tratamientos a evaluar en esta fase. El medio se solidificó con 2 g/l de Phytigel. Una vez sembrados todos los explantes en su correspondiente frasco se sellaron, se marcaron y se llevaron al cuarto de crecimiento bajo las condiciones antes mencionadas (ver sección 3.5.4) durante el tiempo necesario para la formación de los callos.

3.6.7. Realización de subcultivos. Esta labor consistió en transferir los explantes, junto con los callos que habían logrado formar, a un medio de cultivo fresco con la misma composición de los medios preparados inicialmente para cada explante (tratamientos fase de inducción de callos). Una vez transferidos al medio fresco, los explantes se llevaron al cuarto de crecimiento bajo las condiciones anteriormente descritas (sección 3.5.4).



Figura 3. Tipos de explantes de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) utilizados en la fase de inducción de callos. Santa Marta, 1998.

- A: Explante inicial del cual se extraen los explantes definitivos.
- B: Explante inicial cortado por la mitad para extraer los dos tipos de explantes definitivos de la fase de inducción de callos.
- C: Explante definitivo tipo meristemo apical.
- D: Explante definitivo tipo zona meristemática o base de corno.

Estos subcultivos se realizaron con el fin de evitar la oxidación, la cual conlleva a una falla en la toma y asimilación de nutrientes con la posterior muerte de los explantes y/o callos. La frecuencia de estos subcultivos varió de acuerdo al crecimiento mostrado y/o a los problemas de oxidación que presentaban.

Cada vez que se iba a realizar un subcultivo se procedía a sacar el explante del frasco (en cámara de flujo laminar), se les hacía una limpieza procurando retirar la parte oxidada y necrosada del tejido. Los explantes que mostraban niveles de oxidación de moderados a severos fueron sometidos a un enjuague con una solución estéril de ácido cítrico (1 g/l) durante 5 minutos antes de colocar el explante en medio fresco.

3.6.8. Pesada de los callos. Cuando los callos alcanzaron en promedio un tamaño suficiente, los frascos que contenían el callo formado se llevaron uno por uno a la cámara de flujo laminar, se sacaban los explantes que habían producido callo y se colocaron sobre un papel filtro estéril en una caja petri. Luego se procedió a desprender cuidadosamente todo el callo formado utilizando bisturíes y pinzas estériles. El callo desprendido se colocó sobre un papel estéril colocado encima del plato sensible de una balanza electrónica previamente desinfectada. Se tomó la lectura del peso en gramos que registraba la pantalla digital y se hicieron las anotaciones correspondientes.

La balanza electrónica había sido desinfectada limpiando su superficie externa con un algodón humedecido en una solución de detergente y jabón bactericida.

Se enjuagó cuidadosamente con agua estéril y se le hizo una segunda limpieza realizando enjuagues sucesivos con agua estéril e hipoclorito de sodio (NaOCl) al 5.25%. Finalmente la balanza se limpió con un algodón humedecido con alcohol del 96%, procurando que las sustancias empleadas no cayeran en las partes sensibles del aparato para no alterar su funcionamiento. Luego se introdujo la balanza en la cámara de flujo laminar donde se le hizo una limpieza adicional con alcohol del 96%.

Los callos pesados se transfirieron a un medio fresco de composición idéntica a la del medio del cual provenían los callos. El explante inicial, después de haberle desprendido el callo, también fue transferido a un medio fresco de igual composición, para seguir observando su desarrollo.

3.6.9. Transferencia de callos a medio para multiplicación de callos.

Pasados 20 días de la toma del peso de los callos, todos los callos fueron transferidos a un medio semisólido (1.8 g/l de Phytigel) de multiplicación de callos que consistía en el medio básico MS suplementado con 40 mg/l de cisteína, 1 g/l de carbón activado y 1 mg/l de 2,4-D. Los subcultivos se continuaron cada 20 días hasta obtener una cantidad de callo suficiente para iniciar la última fase. Durante este tiempo se hizo el seguimiento del comportamiento del desarrollo de los callos.

3.6.10. Selección del material para la fase de regeneración.

Al hacer el seguimiento del desarrollo de los callos se seleccionaron aquellos que

presentaban una buena tasa de multiplicación, friables y que mostraban características embriogénicas (formación de embriones sobre su superficie), descartando aquellos callos que mostraron síntomas de detención del crecimiento y que presentaron niveles de oxidación severos o necrosis total. Con estos callos embriogénicos (figura 4) se dio inicio a la fase de regeneración.

3.6.11. Siembra en el medio de regeneración. En condiciones asépticas se tomaron fragmentos de aproximadamente 1 cm de diámetro de los callos embriogénicos preseleccionados que mostraran sobre su superficie embriones somáticos en crecimiento y se sembraron en frascos compoteros que contenían 25 ml de los diferentes medios previamente elaborados y correspondientes a los diferentes tratamientos a evaluar en esta etapa. Los medios de esta etapa de regeneración tenían como base la formulación del MS suplementado con 40 mg/l de cisteína, 1 g/l de carbón activado y los respectivos reguladores a evaluar. En todos los medios de esta fase se utilizó como agente gelificante el Phytigel en concentración de 1.8 g/l. Durante el tiempo que se mantuvieron en estos medios se realizaron las observaciones correspondientes al desarrollo de los callos embriogénicos.

3.6.12. Subcultivo de explantes en la fase de regeneración. Para minimizar los niveles de oxidación que se pudieran presentar se procedió a realizar subcultivos en medio fresco con la misma composición planteada en el diseño de tratamientos de la fase de regeneración, con una frecuencia inicial de cada

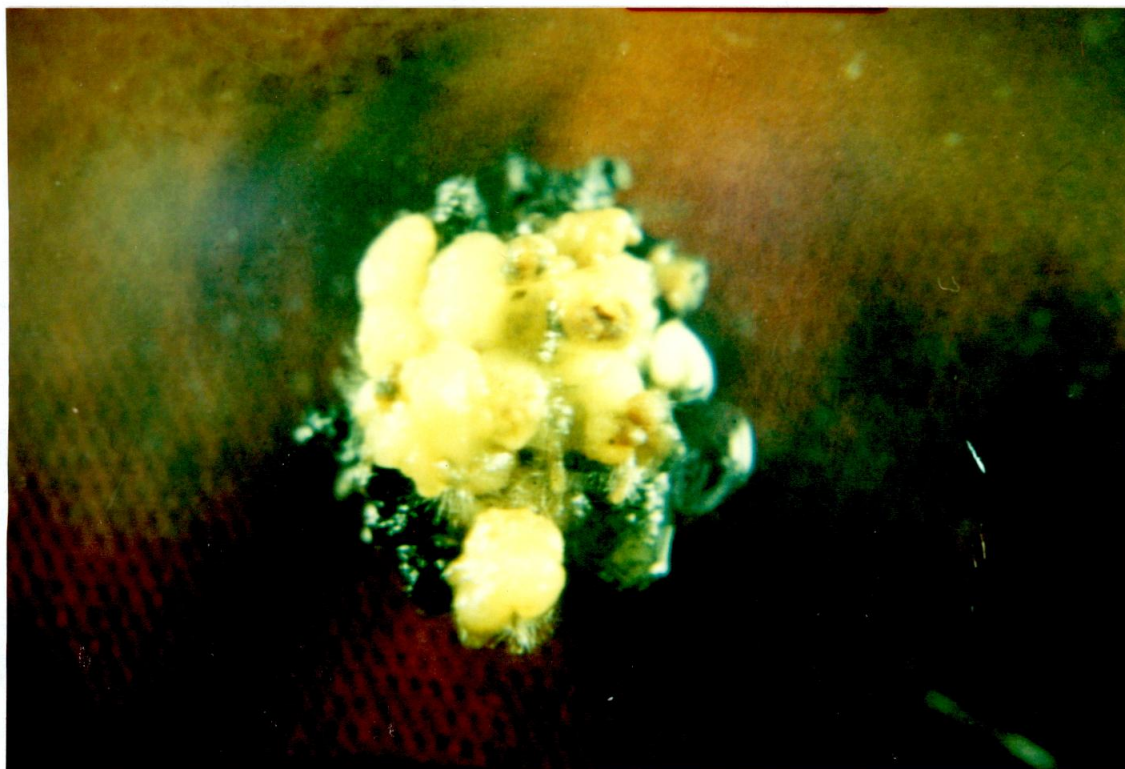


Figura 4. Callo embriogénico de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), mostrando desarrollo de embriones somáticos sobre su superficie, utilizado como explante en la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998.

15 días, la cual se fue variando de acuerdo con el desarrollo de los explantes y la cantidad de oxidación.

3.6.13. Siembra de plántulas en medio básico. Las plántulas que alcanzaron a ser regeneradas fueron transferidas a un medio MS con la mitad de la concentración de las sales ($MS^{1/2}$) suplementado con 40 mg/l de cisteína y sin reguladores para que completaran su desarrollo.

3.6.14. Observaciones al estereoscopio y al microscopio. Se realizaron observaciones al estereoscopio de los embriones para detallar su estructura. Así mismo, se realizaron observaciones al microscopio de placas preparadas con cortes de embriones (en su estado inicial y cuando comenzaron a diferenciarse en plántulas). Para teñir los cortes se utilizó safranina y azul de toluidina. Para la conservación de las placas los cortes fueron colocados en gotas de glicerina. Una vez preparadas, las placas se sellaron con esmalte para uñas.

3.7. PARAMETROS EVALUADOS.

3.7.1. En la fase de inducción de callos. En esta fase se realizaron las siguientes observaciones :

***Número de explantes que desarrollaron callos.** Se procedió a contabilizar todos aquellos explantes (sometidos a los diferentes tratamientos con fitohormonas) donde tuvo lugar la desdiferenciación celular.

***Tiempo de formación de callo.** Se hicieron observaciones diarias de manera que una vez se observó la aparición de callo se contabilizó el tiempo, en días, que tardó en ocurrir dicho proceso.

***Peso del callo (en gramos).** Una vez detectado el primer explante sobre el cual se verificó la formación de callo, se contabilizaron 11 semanas, luego de las cuales se tomó la lectura del peso del callo para todos los explantes que habían logrado desdiferenciarse. El peso de los callos formados se tomó de la lectura dada por los callos en una balanza analítica, siguiendo el procedimiento ya explicado en la sección 3.6.8.

***Tasa de crecimiento de los callos (en miligramos de callo/día).** Este parámetro se calculó dividiendo el peso registrado por cada uno de los callos formados (transformado a miligramos) sobre el número de días de desarrollo de cada uno de los callos (edad del callo al momento de pesarlo).

***Características de los callos.** La determinación de las características de los callos obtenidos (color, forma, friabilidad, etc.) se hizo en forma visual, por ser características de tipo cualitativo.

3.7.2. En la fase de multiplicación de callos. Se realizaron las siguientes observaciones :

***Características del crecimiento de los callos.** Se describió el

comportamiento y las diferentes respuestas mostradas por cada uno de los tipos de callos formados durante la fase de inducción de los mismos, una vez estos fueron transferidos al medio de multiplicación de callos.

***Tiempo de aparición de los embriones somáticos.** En aquellos callos que lograron formar embriones se contabilizó el tiempo en días en que ocurrió este proceso.

***Características de los embriones somáticos.** La determinación de estas características se hizo en forma visual. También se hicieron observaciones al microscopio de los embriones formados.

3.7.3. En la fase de regeneración de plantas. Durante esta etapa se realizaron las siguientes mediciones :

***Desarrollo de los callos embriogénicos y embriones.** Se describió el comportamiento de los explantes una vez fueron transferidos al respectivo medio de regeneración indicando las diferentes respuestas mostradas por los explantes.

***Número de plantas completas regeneradas por tratamiento.** Se hicieron observaciones diarias en cada uno de los frascos correspondientes a cada tratamiento para verificar la regeneración de plantas completas, entendiéndose

por “planta completa” aquella que presenta vástago y sistema radicular completo. En los casos donde se produjo dicha regeneración se contabilizó el número de plantas completas producidas por tratamiento.

***Número total de plantas completas regeneradas.** Una vez determinado el número de plantas completas regeneradas por tratamiento, se contabilizó el total de ellas.

***Tiempo de formación de plantas.** Se contabilizó el número de días en que tuvo lugar la diferenciación de los embriones somáticos en plántulas completas.

***Características de las plántulas regeneradas.** Se describieron las características macromorfológicas visibles de las plantas regeneradas (color de hojas yseudotallo, forma, etc.).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. TRABAJO PRELIMINAR

En esta sección se presentan los resultados del trabajo preliminar realizado con explantes provenientes de vitroplantas, por considerarse de gran utilidad en el estudio de la callogénesis en plátano y porque permitieron tomar ciertas decisiones de fondo al realizar el experimento central definitivo del que trata el presente trabajo de investigación.

4.1.1. Comportamiento de los explantes. Los explantes se comportaron en forma diferente según fuera su procedencia, así :

* Lámina foliar: Amarillamiento progresivo y necrosis posterior del tejido, lo cual indica una falla en la asimilación de nutrientes por parte del explante. Liger hinchamiento inicial de algunos explantes.

* Meristemo apical (Secciones de protocormos): Liger hinchamiento de algunos explantes. Oxidación severa, deshidratamiento general del explante. Liberación al medio de exudados marrones rojizos. Ninguna formación de callo detectada.

* Meristemo apical (brotes meristemáticos): Tanto en los brotes completos como en aquellos que se cortaron longitudinalmente se presentó un aumento de

tamaño de los explantes, con levantamiento y encrespamiento de las vainas foliares. Niveles de oxidación sobre los explantes de leves a moderados, siendo ligeramente inferiores sobre los brotes que se dejaron intactos.

4.1.2. Producción de callo. En los explantes lámina foliar la producción de callo fue prácticamente nula, a excepción de los tratamientos **a** (0.5 mg/l de 2,4-D) y **d** (2.0 mg/l de 2,4-D) en donde se observó en muy pocos explantes un tipo de callo granular, duro y compacto, de coloración amarillo intenso. Este callo mostraba un desarrollo lento y sin incrementos significativos de volumen. Mostró así mismo fuertes niveles de oxidación.

En los explantes tipo meristemo apical se detectaron producciones de callos en los siguientes tratamientos:

* Tratamiento **e** (3.0 mg/l de dicamba): Callo blanquecino, friable, en cantidad muy baja. Ligera oxidación y posterior formación de estructuras globulares embriogénicas.

* Tratamiento **g** (5.0 mg/l de Dicamba): Poco crecimiento, producción muy baja de callo de textura compacta, granular y coloraciones cremas y amarillas.

* Tratamiento **h** (0.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP). Callo friable, abundante, translúcido con algunas zonas de color crema.

* Tratamiento **i** (1.0 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP). Callo cremoso, escaso, friable.

*Tratamiento **j** (1.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP). Callo compacto en muy poca cantidad, coloraciones amarillo-verdoso, alta oxidación. Posterior formación de estructuras embriogénicas globulares y alargadas.

*Tratamiento **k** (2.0 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP). Callo compacto, bastante disgregado alrededor del explante, coloraciones amarillo-verdoso. Oxidación moderada.

*Tratamiento **l** (3.0 mg/l de Dicamba + 0.5 mg/l de BAP). Escasa masa callosa, friable, dispersa, con zonas compactas. Posterior formación de estructuras embriogénicas globulares.

*Tratamiento **m** (4.0 mg/l de Dicamba + 0.5 mg/l de BAP). Callo compacto; en poca cantidad, color crema a amarillo. Oxidación de explantes y callos. Posterior formación de escasas estructuras embriogénicas globulares.

Al subcultivar estos callos en un medio básico (MS sin fitorreguladores) se observó una alta tendencia a la formación de raíces que después de cierto tiempo terminaban necrosándose.

4.2. FASE DE INDUCCION DE CALLOS.

4.2.1. Efecto del tipo de explante en la formación de callos. En todos los casos donde se utilizó como explante el meristemo apical (junto con los primordios de hoja que lo encierran), se produjo la dediferenciación de los

tejidos, diferenciándose los tratamientos en la cantidad de masa callosa producida, el tiempo de formación y algunas otras características.

El caso contrario se dio cuando se utilizó como explante la base del cormo (zona meristemática) en donde no se observó producción de callo bajo ninguno de los tratamientos con fitorreguladores evaluados. En estos explantes, aún después de 6 meses de haberse realizado la siembra en los medios de inducción, no se observó producción alguna de callo. Estos resultados no concuerdan con lo expresado por Novak *et al.* quienes recomendaban, entre varios explantes considerados por ellos como idóneos, los tejidos del cormo. (1991, 101).

Okole y Schulz, trabajando con microsecciones transversales de plátano explicaban que la zona que presentaba una mayor capacidad de producir callo es la zona más cercana al punto meristemático y que esta capacidad de producción de callo disminuía a medida que la microsección se tomaba de una parte más alejada del meristemo y más cercana a la zona de producción de raíces, como es el caso de la base del cormo empleada como explante en este trabajo. (1996, 87).

En algunos casos se observó la inducción de proliferación de callo seguida por una alta oxidación y detenimiento de la proliferación después de cierto tiempo. Es probable que este comportamiento se deba, entre otros factores, a un agotamiento prematuro de algún nutriente en el medio básico. La oxidación no solo se observó sobre los callos formados sino también sobre los tejidos tomados como explantes, mostrándose en niveles variados (más severa en unos

que en otros). Indiscutiblemente, la alta tendencia del plátano a emitir polifenoles al medio, afecta el crecimiento de los callos al dificultar la toma de nutrientes.

De acuerdo con estas observaciones, y según lo expresado por Dodds y Roberts, citados por Barba, es bien claro que las respuestas cualitativas y cuantitativas del crecimiento del callo en cultivo involucran un sinergismo estrecho y complejo entre el origen del tejido usado para la primera inducción, la composición del medio de cultivo y las condiciones físicas que prevalecen durante esta etapa. (1980, 94).

En general, cuando los explantes se sembraron en el medio, experimentaron al cabo de varios días, un ligero hinchamiento de los tejidos que se fue haciendo mayor a medida que pasaron los días.

En los explantes tipo “meristemo apical” se observó el hinchamiento inicial (Figura 5); las vainas de las hojas se levantaron observándose una ruptura de los tejidos de los primordios foliares. Con el paso de los días se observó la aparición de una masa amorfa que indicaba la iniciación de la dediferenciación de los tejidos (formación de callo).

En este tipo de explante se observó la ocurrencia de oxidación en los tejidos con niveles severos en algunos de ellos (Figura 6), pese a la adición de la cisteína (40 mg/l) como antioxidante al medio de cultivo. Sin embargo, aún en estos casos extremos de oxidación la producción de callo se presentó (aunque su posterior crecimiento sí fue afectado), demostrando su aptitud como fuente



Figura 5. Explante tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), creciendo en medio de inducción de callos, mostrando el hinchamiento inicial y señales de una leve oxidación. Santa Marta, 1998.

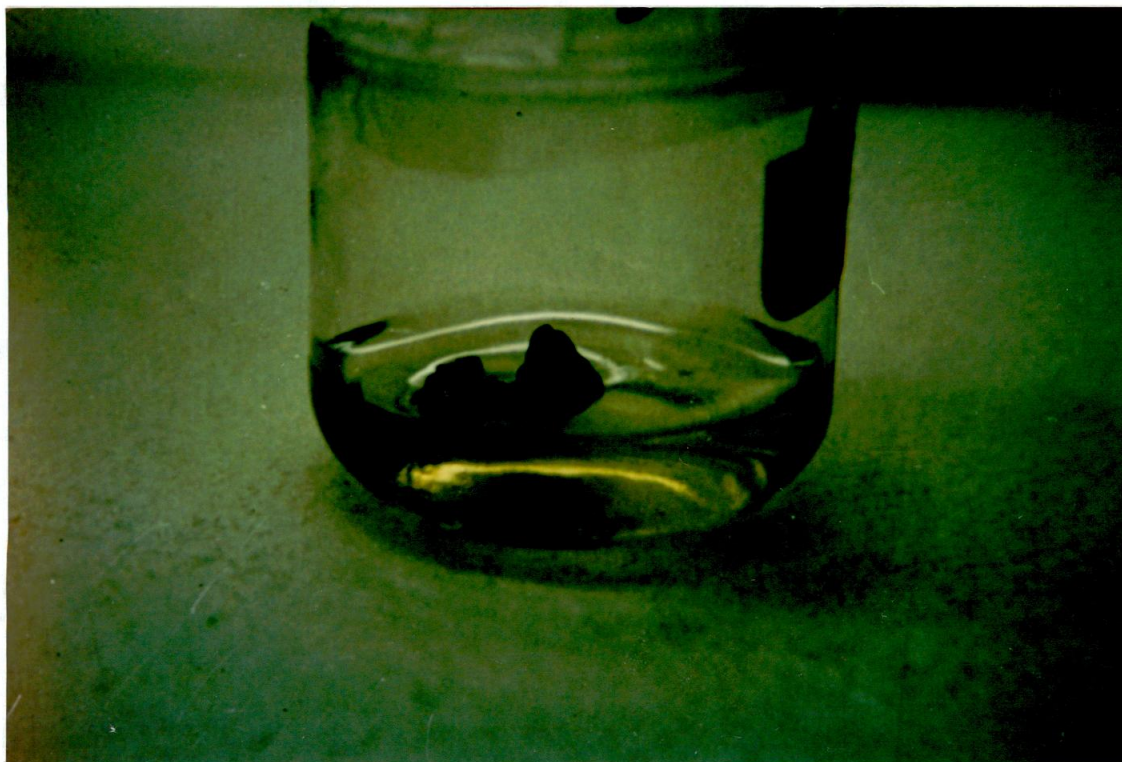


Figura 6. Explante tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) creciendo en medio de inducción de callos, mostrando niveles severos de oxidación. Santa Marta, 1998.

de producción de callo si se someten a niveles adecuados de reguladores en el medio de cultivo y se realiza un control efectivo de la oxidación.

En muchos de los explantes, tipo “base del corno o zona meristemática”, aunque no se dio lugar a la desdiferenciación del tejido sí se produjo un hinchamiento inicial que suponía un crecimiento del mismo y una respuesta inicial al medio condicionado para la inducción (figura 7). Sin embargo, ese crecimiento cesó al cabo de varias semanas.

Este tipo de explante mostró una alta tendencia a la oxidación polifenólica lo que probablemente limitó su crecimiento, impidiendo la toma libre de nutrientes y fitorreguladores del medio, conduciendo en algunos casos a la muerte total del explante. Sin embargo, en los explantes donde la oxidación fue leve o nula tampoco hubo señales de producción de callos, confirmando la poca tendencia de este tipo de tejidos a la producción de callos, a pesar de que, como medida para contrarrestar la oxidación, se realizaron subcultivos del material con mucha más frecuencia que en el caso de los explantes tipo meristemo apical, sumado a inmersiones del explante en soluciones estériles de ácido cítrico. Algunos de estos explantes mantenían el tejido central vivo aún después de varios meses de haber efectuado la siembra.

La oxidación de los explantes ha sido uno de los problemas más graves que han tenido que enfrentar muchos investigadores que han tratado de lograr la desdiferenciación celular en especies que como el plátano tienen tendencia a la liberación de polifenoles. Precisamente, Gómez *et al.* hacen énfasis en la alta oxidación fenólica de los explantes provenientes del campo siendo mayor que



Figura 7. Explante tipo zona meristemática o base del corno de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), creciendo en medio de inducción de callos y mostrando el hinchamiento inicial y presencia de oxidación. Santa Marta, 1998.

cuando se emplean vitroplantas. (1995, 236). De igual forma, Schoofs, utilizando como explantes material provenientes de plantas *in vitro* reportó la muerte prematura de los explantes (cortes) debido a un ennegrecimiento pronunciado del material (formación de polifenoles). (1997, 32).

4.2.2. Peso del callo. En la tabla 4 se reportan los pesos de los callos (expresados en gramos) tomados a las 11 semanas de haberse detectado sobre un primer explante el inicio de la formación de callos. Para la fecha en que se tomó la lectura del peso del callo, la mayoría de ellos mostraban buenos niveles de desdiferenciación.

Como ya se dijo, los explantes tipo “zona meristemática o base del cormo” no produjeron callo, por lo que se consideró innecesario realizar un análisis de los resultados dentro del arreglo original en parcelas divididas. A cambio, se optó por analizar los resultados correspondientes al factor “tipo de explante meristemo apical” como un diseño completamente al azar.

El mayor promedio de producción de callo lo registró el tratamiento **a** (0.5 mg/l 2,4-D) con 0.801 g, seguido por el tratamiento **g** (1.0 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP) con 0.707 g. El menor promedio lo mostró el tratamiento **e**, donde se usó como regulador el dicamba en su dosis más alta (5.0 mg/l) mostrando un valor de 0.093 g.

El análisis de varianza realizado para los datos de peso del callo (Anexo B) arrojó diferencias altamente significativas entre los tratamientos, lo cual pone

Tabla 4. Peso del callo (en gramos) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.

TRATAMIENTO	REPETICIONES			Σ	\bar{X}
	I	II	III		
a	0.768	0.892	0.742	2.402	0.801
b	0.580	0.628	0.514	1.722	0.574
c	0.208	0.172	0.258	0.638	0.212
d	0.592	0.320	0.384	1.296	0.432
e	0.100	0.084	0.096	0.280	0.093
f	0.104	0.062	0.128	0.294	0.098
g	0.426	1.374	0.510	2.310	0.700
h	0.752	0.302	0.628	1.682	0.560
Σ	3.530	3.834	3.260	10.624	0.442

en evidencia que existe un efecto en la inducción de los callos sobre este tipo de explante que depende del tipo y/o dosis de reguladores.

Al realizar la prueba de Tukey (Anexo C) se encontró diferencias significativas entre los tratamientos **a** y **g** con respecto a los tratamientos **e** y **f**. Esta prueba, no encontró diferencias significativas entre los tratamientos **a** y **g**.

Estos resultados revelan que una dosis baja de 2,4-D (0.5 mg/l) es suficiente y más efectiva para iniciar la desdiferenciación celular y obtener buenos niveles de producción de callos, y que al utilizar dosis más altas de este regulador la producción de callo tiende a disminuir.

Las producciones de callos cuando se utilizó el dicamba en los medios de cultivo en general fueron bajas, siendo menores cuando se usaron las dosis más altas y, a excepción del tratamiento **d**, que fue ligeramente superior al tratamiento menos efectivo de 2,4-D (tratamiento **c**), dieron producciones de callos inferiores a las mostradas por los explantes sometidos a las dosis de 2,4-D. Por el contrario, otros investigadores han encontrado excelentes respuestas en producción de callo utilizando dosis más altas de dicamba, tal es el caso de Gómez *et al.*, quienes usaron dosis de 4.56 mg/l de dicamba con buenos resultados tanto en explantes provenientes de campo como en vitroplantas (aunque con mejores producciones en estos últimos). (1995, 237). En igual forma, Sandoval y Tapias, citados por Escalante, Tapias y Sandoval, reportan una óptima producción de callo utilizando 6.0 mg/l de dicamba, aunque el tipo de explante empleado por ellos correspondía a meristemos apicales de vitroplantas. (1991, 39).

Sin embargo, cuando se combinó una dosis promedio de dicamba (4.0 mg/l) con la citocinina BAP (0.5 mg/l) se observó un aumento de la producción de callo con respecto a la misma dosis utilizada sin BAP. La misma tendencia se observó al añadir BAP a los medios que contenían 1.0 mg/l de 2,4-D. Estos resultados sugieren que el BAP podría tener un efecto benéfico en el aumento de la producción de callo, aunque no sea indispensable para que el proceso de desdiferenciación se inicie. Además, el BAP parece tener un efecto sobre las calidades de los callos.

De estas comparaciones, se puede establecer que la respuesta a una misma dosis de un regulador está marcadamente influenciado por el tipo de explante utilizado y el genotipo de la variedad.

4.2.3. Tiempo de formación de los callos. En la tabla 5 se reportan los tiempos de iniciación de la desdiferenciación celular en días (contados a partir de la siembra hasta el momento en que fue visible el crecimiento calloso) en los explantes de plátano hartón sometidos a diferentes dosis y tipos de reguladores.

Tal como se explicó en las secciones anteriores el tipo de explante zona meristemática no produjo callo, por lo tanto, solo se reportan datos de tiempo en los explantes tipo “meristemo apical”. En igual forma que para el parámetro peso del callo, se realizó el análisis estadístico de los datos de tiempo de formación de callo dentro de un diseño completamente al azar para el tipo de explante que logró producir callo.

Los primeros callos aparecieron aproximadamente después de un mes de

Tabla 5. Tiempo de formación de callo (en días) producidos en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998

TRATAMIENTO	REPETICIONES			Σ	\bar{X}
	I	II	III		
a	37	28	33	98	32.6
b	33	38	29	100	33.3
c	47	63	53	163	54.3
d	32	28	35	96	31.6
e	61	49	49	159	53.0
f	61	57	62	180	60.0
g	40	28	37	105	35.0
h	57	54	62	173	57.6
Σ	368	345	360	1073	22.35

haberse sembrado los explantes en el medio de inducción de callos, y los últimos callos en formarse aparecieron aproximadamente a los dos meses.

Al realizar el análisis de varianza para los días a formación de los callos (anexo D) se obtuvo diferencias altamente significativas entre los tratamientos, mostrando que existe un efecto de los tipos y/o dosis de reguladores en el inicio de la desdiferenciación celular.

La prueba de Tukey (anexo E) reveló diferencias altamente significativas entre los tratamientos **c**, **f** y **h** con respecto a los tratamientos **a**, **b**, **d** y **g**; y entre el tratamiento **e** con respecto a los tratamientos **a**, **b** y **d**; a la vez que se encontró diferencias significativas entre los tratamientos **e** y **g**.

De acuerdo a los resultados, el inicio del proceso de desdiferenciación fue mucho más rápido en los tratamientos **a**, **b**, **d** y **g**, en aproximadamente un mes después de la siembra en el medio de inducción, siendo entre estos, el tratamiento **d** (3.0 mg/l de dicamba) en donde se presentó más temprano el inicio de la callogénesis. Además de factores genéticos y nutricionales y de la interrelación con los reguladores de crecimiento, la presencia de niveles moderados de oxidación sobre los explantes y/o callos evidentemente pudo influir en el hecho de presentarse más temprano o más tarde el inicio de la desdiferenciación celular.

En el tratamiento **h** (4.0 mg/l Dicamba + 0.5 mg/l BAP) el inicio de la callogénesis se dio bastante tarde (57.6 días en promedio), aún cuando mostró un buen promedio de peso del callo.

Cuando se utilizaron las dosis más altas de Dicamba (4.0 mg/l y 5.0 mg/l) y de 2,4-D (1.5 mg/l), la formación de callos tardó más tiempo en ocurrir (alrededor de dos meses).

Al combinar una dosis promedio de 2,4-D con la citocinina BAP en dosis de 0.5 mg/l el tiempo de inicio de la callogénesis fue similar a cuando se usó la misma dosis de auxina pero sin citocinina.

A partir de estos resultados se deduce que las dosis bajas de 2,4-D y la menor dosis de dicamba permiten iniciar callogénesis mucho más temprano sobre los explantes tipo meristemo apical. Sin embargo, la escogencia o no de una de estas dosis para utilizarla en programas de producción de callos va a depender de la tasa de crecimiento posterior que muestren éstos, la cual a su vez influirá en la cantidad total de callo producido por cada explante.

De acuerdo a este análisis, contrario a lo que se podría pensar, en general, el tiempo de inicio de la callogénesis no sostiene una relación directa con el peso del callo, pues el peso registrado por determinado callo dependió más del crecimiento posterior de dicho callo (regido por la capacidad de división celular intrínseca del callo y por su interacción con la composición del medio y los factores ambientales).

Los resultados mostrados aquí en cuanto al tiempo de formación de callos, son similares a los presentados por Novak *et al.*, quienes reportaron la aparición de callos después de uno a dos meses de la siembra en un medio con una mezcla de auxinas; utilizando como fuente de explante, flores masculinas de banano y

plátano. (1990, 8). Igualmente concuerdan con los resultados de Gómez *et al.*, quienes mencionan tiempos para formación de callos entre 40 y 60 días para explantes provenientes de campo y de vitroplantas. (1995, 237).

4.2.4. Tasa de crecimiento de los callos. Una vez iniciado el proceso de desdiferenciación de los tejidos usados como explantes, factores intrínsecos y externos al mismo explante interactúan de manera que el ritmo de producción de callo varía para cada explante, lo cual explica las notorias diferencias entre los pesos finales de callos obtenidos por cada explante que no necesariamente corresponden a la premisa de que el callo que se inicia más temprano muestra un mayor peso final. También es preciso entrar a considerar la ocurrencia de niveles moderados de oxidación sobre los explantes y/o sobre los callos, que evidentemente pudieran influir sobre la tasa de crecimiento posterior de los callos. Esta heterogeneidad de ritmos de producción de callos se evidencian en la tabla 6, la cual muestra las tasas de crecimiento de los callos obtenidos a partir de explantes tipo meristemo apical, expresadas en miligramos de callo producido por día.

Las mayores tasas de crecimiento de los callos las reportó el tratamiento **h** (4.0 mg/l de dicamba + 0.5 mg/l de BAP) con un valor promedio de 11.56 mg de callo/día, seguido por los tratamientos **a** (0.5 mg/l de 2,4-D) con un valor promedio de 10.76 mg/día y **g** (1.0 mg/l de 2,4-D + 0.5 mg/l de BAP) con un valor promedio de 10.34 mg/día. El tratamiento que mostró la menor tasa de crecimiento fue el **e**, donde se usó como regulador el dicamba en dosis de 4.0 mg/l, mostrando un valor promedio de 1.75 mg de callo/día.

Tabla 6. Tasa de crecimiento del callo (en miligramos de callo/día) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.

TRATAMIENTO	REPETICIONES			Σ	— X
	I	II	III		
a	10.97	11.29	10.02	32.28	10.76
b	7.83	9.10	6.58	23.51	7.83
c	3.46	3.90	4.77	12.13	4.04
d	7.89	4.05	5.33	17.27	5.75
e	2.17	1.44	1.65	5.26	1.75
f	2.26	1.24	2.80	6.30	2.11
g	6.35	17.39	7.28	31.02	10.34
h	15.04	5.69	13.95	34.68	11.56
Σ	55.97	54.10	52.38	162.45	54.14

El análisis de varianza realizado para los datos de tasa de crecimiento de los callos (anexo F) arrojó diferencias altamente significativas entre los tratamientos, lo cual sugiere que existe una influencia marcada del tipo y/o dosis de reguladores sobre la tasa de crecimiento posterior de los callos.

Al realizar la prueba de Tukey (anexo G) se encontró diferencia significativa entre los tratamientos **a** y **h** con respecto a los tratamientos **e** y **f**; y entre el tratamiento **g** con respecto al tratamiento **e**. Esta prueba no encontró diferencias estadísticas entre los tratamientos **a**, **g** y **h**.

Los tratamientos **g** y **h** (donde se combinó la dosis promedio de la auxina correspondiente con la citocinina BAP) presentaron tasas de crecimiento altas y similares entre sí, atribuibles al efecto benéfico de la citocinina BAP sobre el crecimiento de los callos de plátano hartón al combinarla con una auxina.

Precisamente, el tratamiento **h**, a pesar de haber mostrado un inicio de la callogénesis bastante tarde, mostró la mejor tasa de crecimiento, gracias a lo cual el promedio de peso de callo mostrado por este tratamiento fue mejor que el presentado por los demás tratamientos en donde la callogénesis se inició tarde pero cuyo crecimiento fue bajo (tratamientos **e**, **c** y **f**). Sin embargo, a pesar de mostrar esta alta tasa de crecimiento su promedio de peso, aunque bueno, no fue de los más altos siendo superado por los tratamientos **a**, **g** y **b** (situación explicable por las diferentes edades mostradas por los callos en el momento de tomar la lectura de peso del callo).

Analizando la tabla se observa que a medida que se aumenta la dosis de 2,4-D,

la tasa de crecimiento va disminuyendo. Es así como utilizando la menor dosis de 2,4-D (0.5 mg/l) se obtuvo una de las mayores tasas de crecimiento para los callos, además de que este tratamiento permitió un inicio bastante rápido de la callogénesis.

En cuanto a las dosis de dicamba, las tasas de crecimiento arrojados por los callos fueron bajas (siendo mucho más baja con las dosis mayores). Únicamente la dosis más alta de 2,4-D fue superada en el valor de la tasa de crecimiento por la dosis más baja de dicamba utilizada.

Así, a pesar de que en el tratamiento d fue donde se inició más temprano la callogénesis, el crecimiento de los callos formados como respuesta a este tratamiento fue muy lento y se detuvo después de varias semanas. Esto explica el porqué este tratamiento arrojó una baja producción de callo cuando se tomó la lectura de peso del callo (ver sección 4.2.2.).

4.2.5. Características de los callos. Como respuesta a los diferentes tratamientos de fitorreguladores, se presentaron diferentes tipos de callos sobre los explantes tipo meristemo apical, los cuales teniendo en cuenta las características de los callos descritos en otros trabajos de investigación al compararlas con las características que se observaron durante el curso de la presente investigación; fueron agruparon dentro de tres tipos o clases distintas:

* Callo tipo I. Este tipo corresponde a un callo de consistencia esponjosa y friable (ver figura 8), lo que se comprobó al retirar con el bisturí el callo formado para subcultivarlo en un medio nuevo, mostrándose fácil de

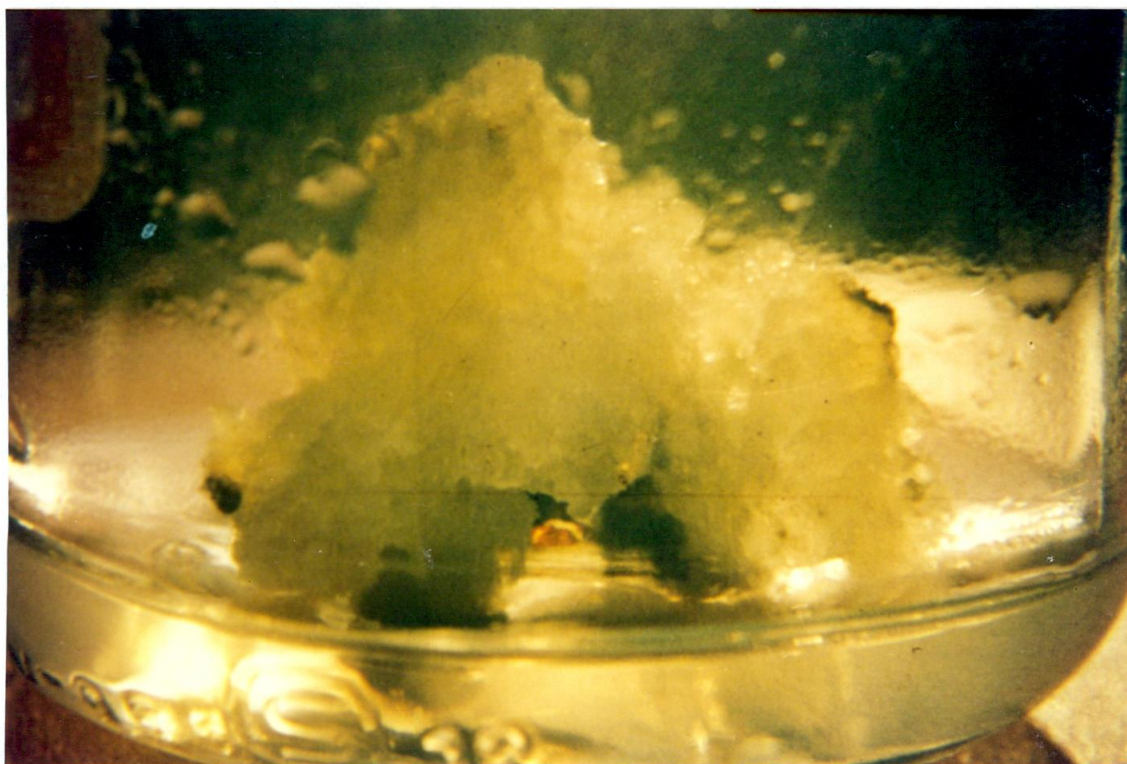


Figura 8. Callo tipo I, de características ideales para estudios de embriogénesis somática, producido sobre explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) bajo el efecto de reguladores de crecimiento durante la fase de inducción de callos. Santa Marta, 1998.

desprender y de disgregar. Al colocar una porción de callo en un medio de cultivo líquido y someterlo a agitación por varias horas se producía la disgregación del mismo. Este tipo de callo presentó coloraciones de blanco a amarillo cremoso, variando la tonalidad de los mismos de suave a intenso, con algunas zonas translúcidas (especialmente en las etapas iniciales de la desdiferenciación).

Este tipo de callo, según la literatura, se recomienda como inóculo óptimo para iniciar estudios de suspensiones celulares (Szabados , Mroginski y Roca, 1991, 175).

Normalmente mostraron buenas tasas de crecimiento por lo que en muchos casos llegaban a cubrir la mayor parte de la superficie del explante.

* Callo tipo II. Este tipo corresponde a callos de textura compacta y granulados (especialmente en las zonas externas), difíciles de desprender y cuyo crecimiento en términos generales fue muy lento (tratamientos e y f). Presentaron coloraciones amarillo verdosas y frecuentemente se localizaban dispersos sobre zonas del explante.

* Callo tipo III. Este tipo corresponde a callos de consistencia semiesponjosa, algo acartonada, mostrando áreas de textura granulada que al unirse se tornan compactos. Mostraron coloraciones que varían de amarillo intenso a amarillo verdoso.

La producción de callo se presentaba ya sea sobre toda la superficie del

explante o en zonas determinadas del mismo (principalmente la base de los primordios foliares que recubrían el meristemo) o bien completamente dispersos sobre la superficie del explante. Sobre algunos explantes se notó la presencia de una mezcla de estos tipos de callos (ejemplo tratamientos **c**, **d** y **h**).

En la tabla 7 se reportan los diferentes tratamientos evaluados indicando el respectivo tipo de callo formado, de acuerdo con la clasificación ya descrita.

Analizando dicha tabla puede observarse que los tratamientos **a**, **b** y **g** presentan prevalencia de callos tipo I, mostrando buenas producciones de callos y, en términos generales, buenas tasas de crecimiento iniciales pese a la presencia de niveles moderados de oxidación sobre algunos explantes.

En los tratamientos **e** y **f** (donde se utilizó dicamba como regulador) se presentaron callos tipo II, generalmente en cantidades muy pocas, pues su crecimiento fue muy lento, a pesar de los subcultivos realizados con el objeto de reemplazar el medio agotado y contrarrestar el efecto de la oxidación de los explantes.

En los tratamientos **c** y **d** se lograron reconocer los tipos de callos tipo II y III, prevaleciendo estos últimos sobre los explantes sometidos al tratamiento **d**.

En el tratamiento **h** el tipo de callo que se presentó en mayor proporción fue el tipo I, aunque se presentaron algunos explantes con callos tipo III.

Tabla 7. Tipos de callos formados sobre explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) sometidos a diferentes niveles y tipos de reguladores. Santa Marta, 1998.

TRATAMIENTO	TIPOS DE CALLOS
a	I
b	I
c	II y III
d	II y III
e	II
f	II
g	I
h	I y III

Además de factores genéticos propios de la planta madre donadora del explante, las coloraciones que muestran los callos pueden deberse a factores nutricionales y ambientales manifestados por la presencia de clorofila, carotenos, o antocianinas. (Bermúdez y León, 1994, 54).

4.3. FASE DE MULTIPLICACION DE LOS CALLOS

4.3.1. Desarrollo de los callos. El análisis de los estudios realizados sobre callogénesis a lo largo de los años ha permitido establecer las posibles respuestas de un cultivo de callo dependiendo de factores diversos. Así, un callo puede formar brotes, raíces, embriones, etc., o simplemente continuar proliferando como callo, dependiendo esta orientación de las cantidades relativas de auxina y citocininas suministradas. (Abbot, 1978, 79). Por otra parte, los efectos sinérgicos de los fitorreguladores pueden ser modificados por otros factores, como son los constituyentes del medio de cultivo (azúcar, aminoácidos, etc.) y las condiciones físicas (iluminación, temperatura, consistencia del medio, etc.), aunque siempre se manifestará como factor dominante el balance hormonal. (Aloni, 1980, 255).

Teniendo en cuenta esto, es fácil comprender las diversas respuestas o comportamientos mostrados por los callos obtenidos en el presente experimento (bajo el efecto de los tratamientos evaluados durante la fase de inducción) al ser transferidos al medio de multiplicación de callos.

Algunos callos (como los provenientes de los tratamientos **a** y **g**) presentaron una buena tasa de crecimiento, y después de un corto período de adaptación al

nuevo medio en el que se observaba una tendencia a la detención del crecimiento, volvía a ser notorio el crecimiento y la producción de más callo a partir del existente. Inclusive, a veces el crecimiento fue tan rápido que el agotamiento del medio se producía rápidamente obligando a realizar subcultivos más frecuentes.

La realización de dichos subcultivos se justificó debido a que tal como lo mencionan Yeoman y Macleod, citados por Hurtado y Meriño, la falta de transferencia lleva irremediablemente al debilitamiento, intoxicación y muerte del tejido. (1980, 96). Esto es debido a que el crecimiento y la multiplicación celular son tan intensos que provocan el gasto de los nutrientes del medio; además, debido a la evaporación el medio sólido se deshidrata; también la acumulación de metabolitos de desecho puede llegar a ser tan alta que se vuelven tóxicos para el tejido.

Por otro lado, se dieron casos de callos que mostraron una buena tasa de crecimiento inicial al ser transferidos al medio de multiplicación, pero que luego del segundo o tercer subcultivo experimentaban una reducción o detención del crecimiento, indicando un agotamiento en su capacidad de producción y división, sugiriendo que, además de la frecuencia de los subcultivos, debe tenerse cuidado con el número de ellos que se realicen (teniendo en cuenta la edad de los callos), pues tal como lo expresan Litz y Jarret, después de un período prolongado de cultivo, el potencial embriogénico del callo declina (pérdida de totipotencia), asociándose este hecho con una acumulación de cambios genéticos en las células. (1993, 151). Esta situación

obliga, para efectos de la inducción de la diferenciación de los callos, a descartar aquellos callos demasiados viejos.

En general, los callos que durante la fase de inducción de callos habían mostrado un crecimiento lento (tratamientos **e** y **f**), continuaron con esta tendencia y su multiplicación fue muy difícil. Dicho comportamiento puede deberse a aspectos genéticos intrínsecos del explante tomado como fuente de producción de callos, sumado a la acción de los reguladores inicialmente usados con el fin de inducir la callogénesis en dichos explantes.

Por el contrario, los callos provenientes de los tratamientos donde se había utilizado dicamba en dosis de 3.0; 4.0 y 5.0 mg/l y que no habían mostrado un buen crecimiento inicial, mostraron indicios de reactivar su crecimiento produciendo más callo.

Una respuesta diferente se presentó cuando después de subcultivar algunos callos en el medio de multiplicación se produjo la emisión de raíces (ver figura 9). Esta situación fue más evidente cuando se subcultivaron muestras de callo en un medio MS sin reguladores. En estos casos, las raíces crecían rápidamente alcanzando varios centímetros de longitud y produciendo numerosos pelos absorbentes, para entrar finalmente a una etapa de necrosis y muerte, probablemente por el agotamiento de nutrientes del medio de cultivo. Esta tendencia a la producción de raíces a partir de callos de plátano ya había sido reportada por otros investigadores. (Gómez *et al.*, 1995, 236). (Okole y Schulz, 1996, 189).

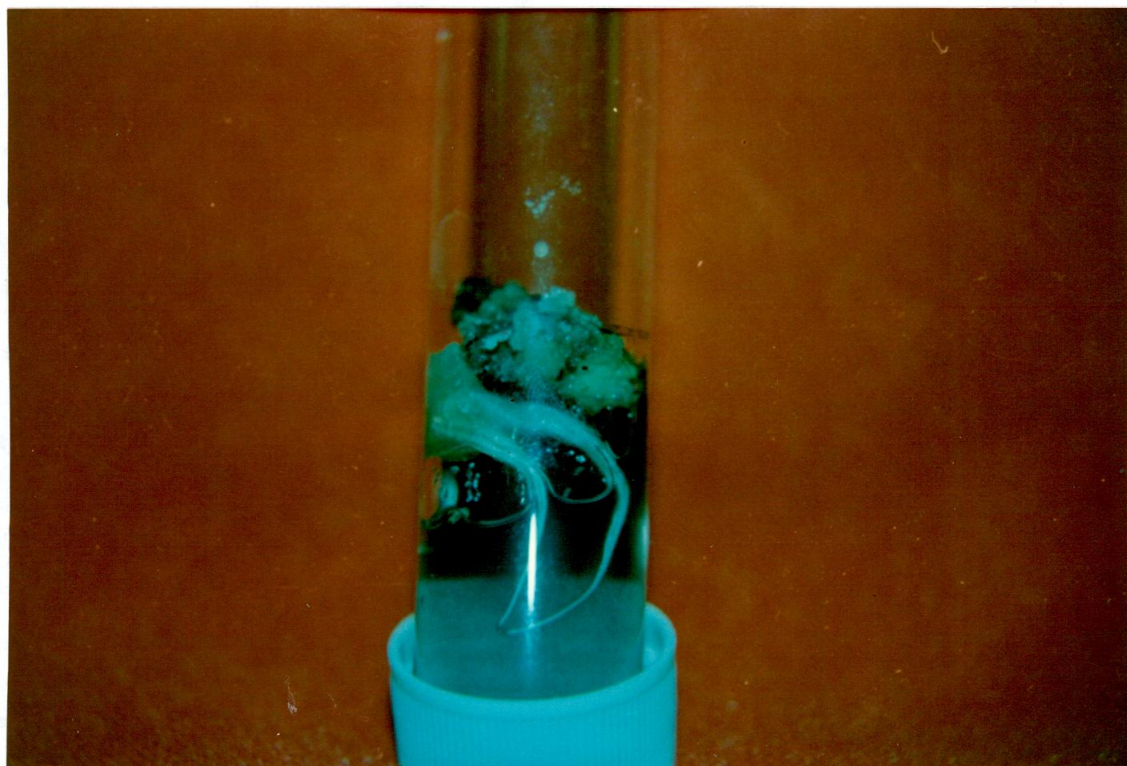


Figura 9. Diferenciación celular de callos (emisión de raíces) de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) en el medio de multiplicación de callos (MS + 1.0 mg/l 2,4-D + 40 mg/l de cisteína + 1.0 g/l de carbón activado). Santa Marta, 1998.

Aquellos callos que mostraron mezclas de los diferentes tipos, al ser transferidos al medio de multiplicación de callos (con una auxina diferente) experimentaron un ligero incremento de la producción de callo tipo I. El callo más compacto crecía en forma más lenta.

La oxidación polifenólica observada durante la fase de inducción de callos continuó presentándose durante esta etapa de multiplicación. En muchos casos este fenómeno condujo a la muerte de gran cantidad de material. La adición al medio de los antioxidantes cisteína y carbón activado logró un cierto control de este fenómeno, pero no en un 100%.

4.3.2. Aparición de embriones somáticos. Durante esta fase intermedia se pretendía multiplicar el material inicial (masa de callos) para contar con una cantidad suficiente (lo más uniforme posible) y montar la fase de regeneración en la cual se trataría de inducir la diferenciación de estos callos en embriones somáticos y posteriormente la germinación de estos últimos hasta dar origen a plantas completas. Sin embargo, durante el transcurso del experimento se detectó la formación de estructuras que, de acuerdo con sus características morfológicas e histológicas y teniendo en cuenta las descripciones realizadas en otros trabajos de investigación sobre embriogénesis somática, fueron considerados como embriones somáticos. Normalmente estas estructuras se formaban sobre los callos obtenidos, una vez se transferían éstos al medio de multiplicación de callos. De acuerdo con lo expuesto, se puede hablar de una tendencia a la emisión natural de embriones somáticos, que si bien pudo ser influenciada por el cambio de reguladores en el medio de cultivo (del medio de

inducción al medio de multiplicación), al parecer dependió más del tipo de callo formado y de su tasa de crecimiento.

Inclusive, autores como Dublin señalan que el momento de aparición de los primeros embriones, la tasa de embriogénesis (porcentaje de explantes que producen embriones) y el número de embriones producidos por explante dependen de varios factores, entre ellos, las combinaciones de auxina/citocinina utilizadas en la etapa inicial, la duración de esta misma etapa, el origen del explante y el estado fisiológico de la planta de la que se tomaron los explantes. (1993, 586).

El tiempo de aparición de los embriones somáticos fue sumamente variable. Su aparición se detectó en un rango de tiempo de 1 a 4 meses (tabla 8) después de haberse observado la aparición de los callos y luego de su transferencia al medio de multiplicación de callos, a excepción de algunos provenientes de los tratamientos **b** y **d** cuya diferenciación en embriones somáticos dio inicio en el mismo medio inicial de inducción, aunque se observaron dispersos sobre el callo.

El menor tiempo de aparición de embriones somáticos se observó a los 25 días (en el medio inicial) en algunos callos provenientes del tratamiento **b**, correspondiendo a callos tipo I. En forma general, los callos tipo I fueron los que más rápidamente iniciaron la formación de estructuras embriogénicas. Los callos donde los embriones tardaron más en aparecer fueron los provenientes de los tratamientos **c** (83 días para los callos tipo II y 78 para los tipo III) y **f** (94 días para callos tipo II). Después de iniciarse el proceso de diferenciación de

Tabla 8. Tiempo de aparición (en días) de los primeros embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), contados a partir del momento en que se detectó la formación de callo, de acuerdo a la procedencia de los tratamientos de la fase de inducción de callos y al tipo de callo desarrollado. Santa Marta, 1998.

TRATAMIENTO DE ORIGEN		TIEMPO DE APARICION
TRATAMIENTO	TIPO DE CALLO	(días)
a	I	83
b	I	25
c	II	83
	III	78
d	II	64
	III	59
e	II	59
f	II	94
g	I	38
h	I	59
	III	0

los callos en embriones, la frecuencia posterior de aparición de embriones varió dependiendo de las condiciones de madurez y de crecimiento de los callos. Los callos tipo I continuaron mostrando una mejor tasa de aparición de embriones comparados con los otros tipos.

La mayor cantidad de embriones somáticos se observó durante las semanas 3 y 4 en el medio de multiplicación, disminuyendo posteriormente el ritmo de formación de los mismos.

En los callos donde se observó una mayor producción de embriones fue en los provenientes de los tratamientos **a**, **b**, y **g** (que correspondían a callos tipo I), los cuales provenían de las dosis bajas de auxinas. En estos callos los embriones se distribuían cubriendo gran parte del tejido calloso y se podían observar en diferentes estados de crecimiento (figura 10), incluso en los casos donde se presentaba una necrosis moderada, lo que a primera vista es un indicativo de la capacidad embriogénica de dichos callos.

Por el contrario, en ciertos callos provenientes del tratamientos **f** (que correspondían a callos tipo II) la producción de embriones fue nula o muy baja, mostrándose en este último caso en forma dispersa alrededor del callo, indicando su bajo potencial embriogénico, sobre todo si se descartan posibles influencias de la oxidación, que en este caso fue bastante baja.

La oxidación siguió afectando el crecimiento de algunos callos al parecer limitando la aparición de embriones somáticos, aunque no en forma definitiva, ya que, si bien muchos callos que experimentaron niveles severos de oxidación

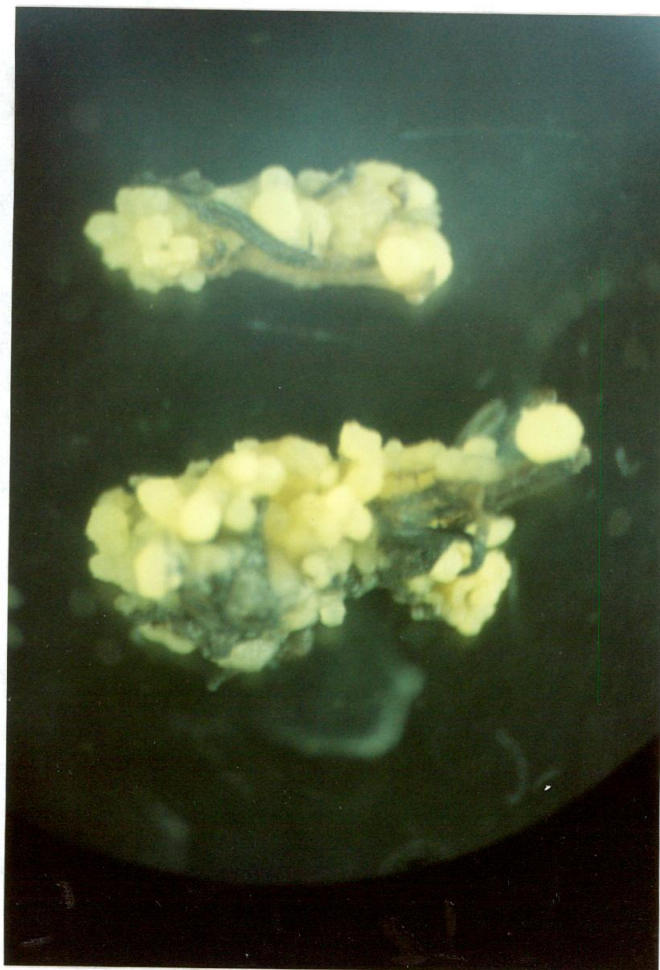


Figura 10. Diferenciación celular de callos (producción de embriones somáticos) de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) en el medio de multiplicación de callos (MS + 1.0 mg/l 2,4-D + 40 mg/l de cisteína + 1.0 g/l de carbón activado). Obsérvese la abundante producción de embriones en diferentes estados de crecimiento. Santa Marta, 1998.

no mostraron desarrollo de embriones somáticos, algunos (como ciertos callos provenientes de los tratamientos **e** y **f**), a pesar de los elevados niveles de oxidación que experimentaron, mostraron desarrollo de algunos embriones somáticos en las partes más externas de los callos (figura 11).

Sin embargo, es de tener en cuenta que el nivel de oxidación del explante, el número y/o frecuencia de subcultivos, las condiciones nutricionales del medio y las condiciones exógenas (fotoperíodo y temperatura), tienen mucho que ver con la tasa de crecimiento y proliferación de embriones somáticos, pues con el paso de las semanas, muchos de los embriones que habían logrado formarse se tornaron de un color oscuro hasta llegar al ennegrecimiento total y por consiguiente a la muerte. Inclusive, luego de los subcultivos a medio nuevo, a veces el material experimentaba un estrés y su crecimiento se detenía por unos pocos días, al cabo de los cuales seguían creciendo, produciendo en algunos casos inicialmente más callo y luego más embriones somáticos. Este comportamiento indica a las claras la necesidad de realizar subcultivos de acuerdo con el desarrollo de los callos y los embriones, sin exagerar en su número (lo que podría conducir a una pérdida de viabilidad de las estructuras embriogénicas) o de modificar los componentes del medio para ajustarlo más a las necesidades de crecimiento de los embriones recién formados, de manera que permita su adecuada y completa maduración como requisito para la germinación en un medio de regeneración.

A la par de la formación de embriones, muchos callos embriogénicos continuaron emitiendo raíces (figura 12).



Figura 11. Callo de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), proveniente de explantes tipo meristemo apical mostrando niveles altos de oxidación y crecimiento de embriones somáticos en la parte más externa. Santa Marta, 1998.

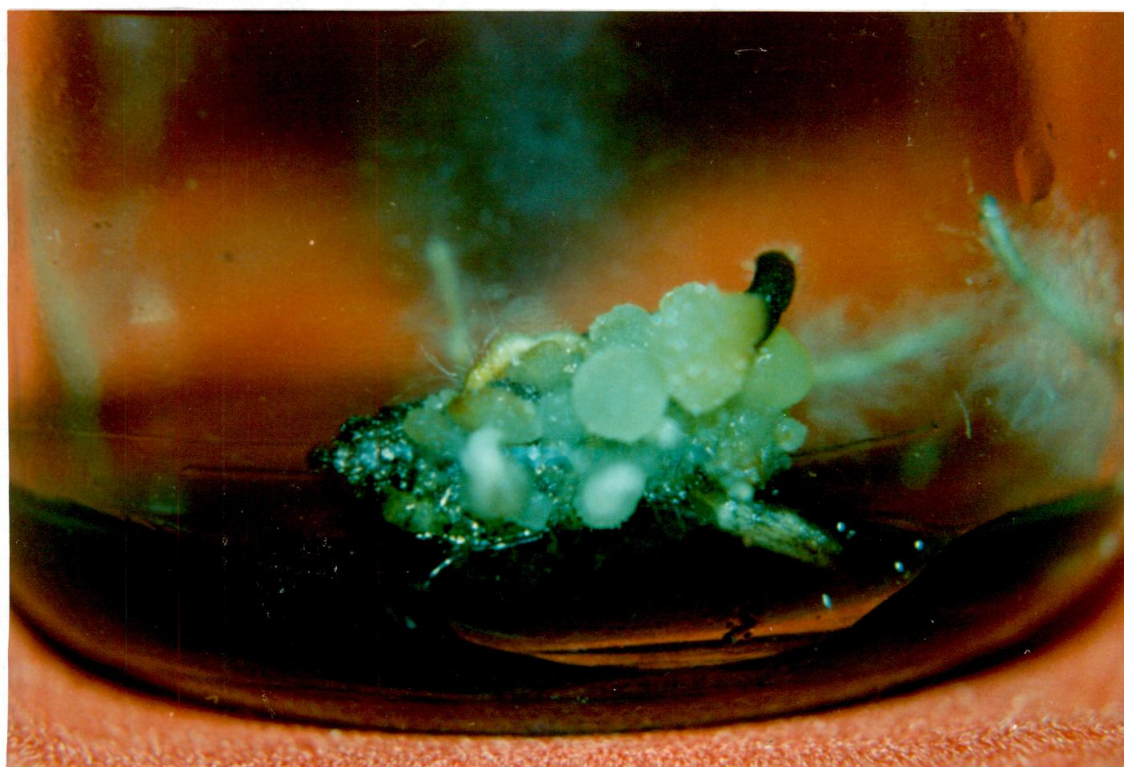


Figura 12. Diferenciación celular de callos (producción simultánea de embriones somáticos y raíces) de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) en el medio de multiplicación de callos (MS + 1.0 mg/l 2,4-D + 40 mg/l de cisteína + 1.0 g/l de carbón activado). Santa Marta, 1998.

4.3.3. Características de los embriones somáticos formados. Las estructuras embriogénicas somáticas aparecen inicialmente como estructuras de forma globular con superficies normalmente irregulares (figura 13), de coloraciones crema a amarilla y de una consistencia bastante blanda. Estas estructuras aparecían generalmente en las zonas más externas de los callos, y en algunos casos muy cercanos a los puntos de crecimiento de los explantes que tenían callos. Posteriormente, dependiendo del ciclo de desarrollo del embrión y de la cantidad de embriones que seguían formándose, aparecían otras formas diferentes (redondeadas o globulares, ovales o alargadas, algunos con invaginaciones).

En cuanto a la coloración mostrada por las estructuras embriogénicas, ésta iba de crema a amarillo con tonalidades que variaban de claras a intensas.

En la tabla 9 se resumen las características morfológicas observables de los embriones somáticos producidos en el medio de multiplicación de callos teniendo en cuenta el tratamiento de la fase de inducción de callos del cual procedían. No se encontró relación estrecha entre el tipo de callo sobre el cual se originaban los embriones somáticos (tipos I, II y III) y las características mostradas por los embriones. Lo que sí se pudo notar fue que en aquellos callos en donde la producción de masa callosa era escasa, especialmente de los tipos II y III, la producción de embriones era escasa o nula y normalmente se podían encontrar embriones globulares que correspondían a embriones de las etapas iniciales (estados globular y corazón) en mayor proporción que los embriones alargados (correspondientes al estado de torpedo del embrión), indicando que los embriones mostraban dificultad para cumplir su ciclo de

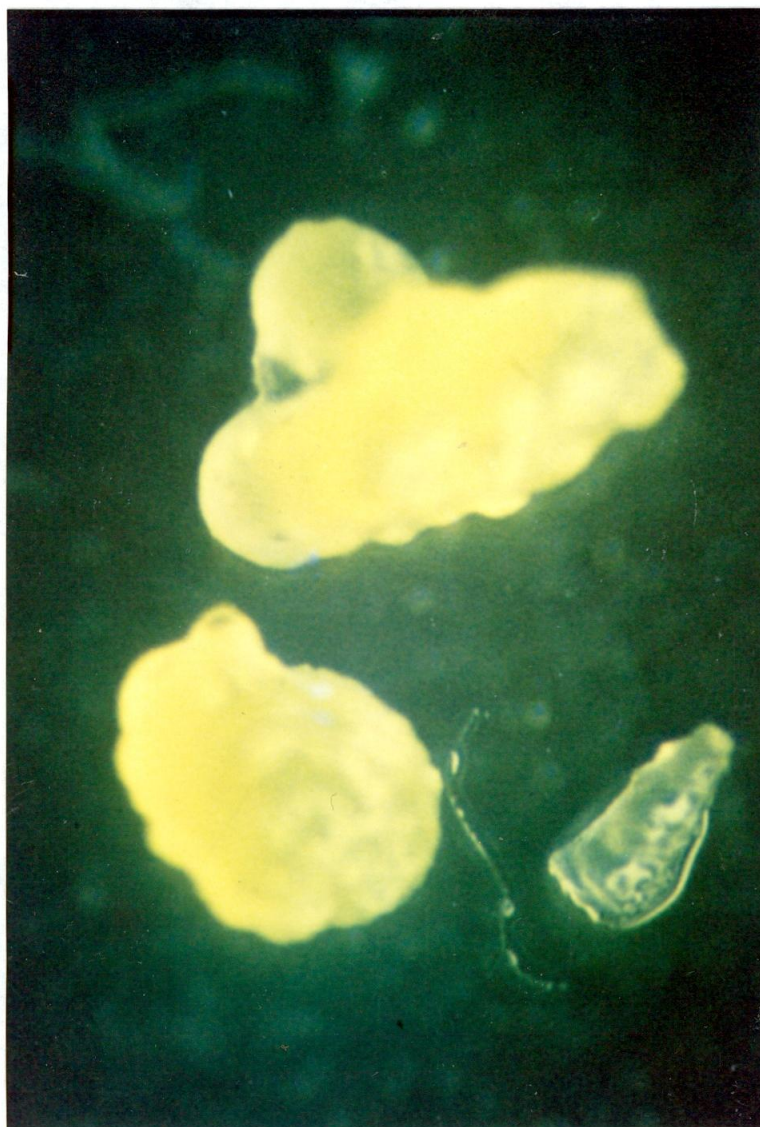


Figura 13. Observación al estereoscopio de embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando la coloración y la superficie irregular que los caracteriza. Santa Marta, 1998.

Tabla 9. Características de los embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), formados a partir de callos provenientes de explantes tipo meristemo apical sobre un medio de multiplicación de callos, de acuerdo con el tratamiento de procedencia de la fase de inducción de callos. Santa Marta, 1998.

TRATAMIENTO DE ORIGEN	CARACTERÍSTICAS DE LOS EMBRIONES SOMATICOS
a	Abundantes, cremas, globulares y alargados
b	Abundantes, amarillo intenso con zonas claras, alargados y globulares
c	Muy pocos, dispersos, globulares, amarillo intenso
d	Abundantes, globulares cremas y amarillo claro a intenso.
e	Muy pocos, globulares, amarillo
f	Muy pocos, alargados, amarillos
g	Abundantes, crema y amarillos, alargados y globulares. En otros explantes: muy pocos, dispersos, amarillos, alargados
h	Abundantes, alargados, cremas, amarillos, globulares

desarrollo y maduración. Esta situación era más evidente cuando los niveles de oxidación eran mayores.

4.4. FASE DE REGENERACION DE PLANTAS

Una vez las secciones de callos embriogénicos seleccionados (explantes) fueron transferidos a los correspondientes medios de regeneración, según el diseño establecido, éstos continuaron su crecimiento mostrando diversas tendencias o respuestas, dependiendo de aspectos propiamente nutricionales, ambientales o genéticos, las cuales pueden apreciarse en la tabla 10. Estos distintos tipos de respuestas se explicarán con detalle en los apartados que se presentan a continuación.

4.4.1. Formación de nuevos callos y/o embriones. Muchos explantes produjeron nuevas masas callosas a partir del callo embriogénico, especialmente en las zona de los bordes de los explantes (figura 14). Este comportamiento implicaba inicialmente una detención del proceso de diferenciación de embriones somáticos. Inclusive, algunos de los embriones que ya estaban formados cuando los explantes se colocaron en el respectivo medio de regeneración experimentaron un oscurecimiento progresivo hasta necrosarse y morir. Esta respuesta se presentó tanto sobre los explantes sometidos al medio MS con la concentración completa de sales como al medio con la mitad de la concentración de dichas sales. Incluso, no se observó una relación clara entre las dosis de reguladores y esta respuesta. La explicación de este comportamiento podría estar en el hecho de existir niveles endógenos de fitorreguladores (especialmente auxinas) como consecuencia del prolongado

Tabla 10. Tipos de respuestas mostradas por los callos embriogénicos (explantes) de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) durante la fase de regeneración de plantas, de acuerdo con los tratamientos evaluados.

FACTOR 1 (MS)	FACTOR 2 (AUXINA)	TIPOS DE RESPUESTAS					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
MS COMPLETO	Con ANA	C,E,I,R	C,R	C,E,I,R	C,I,R	C,I,P,R	C,R
	Sin ANA	C,I,R	C,I,R	C,E,I	C,I,R	C,E,R	C,I,R
MS ½	Con ANA	C,I	C,I	C,E,I,P,R	C,E,I,R	C,I,P,R	C,P,R
	Sin ANA	C,I,R	C,E,I,R	C,I,P,R,E	C,E,I,P,R	C,R	C,I,R

C : Formación de callo

E : Formación de embriones somáticos (adicionales a los sembrados)

I : Embriones somáticos que iniciaron su diferenciación pero que no regeneraron plantas completas

R : Formación de raíces

P : Diferenciación de embriones somáticos en plantas completas

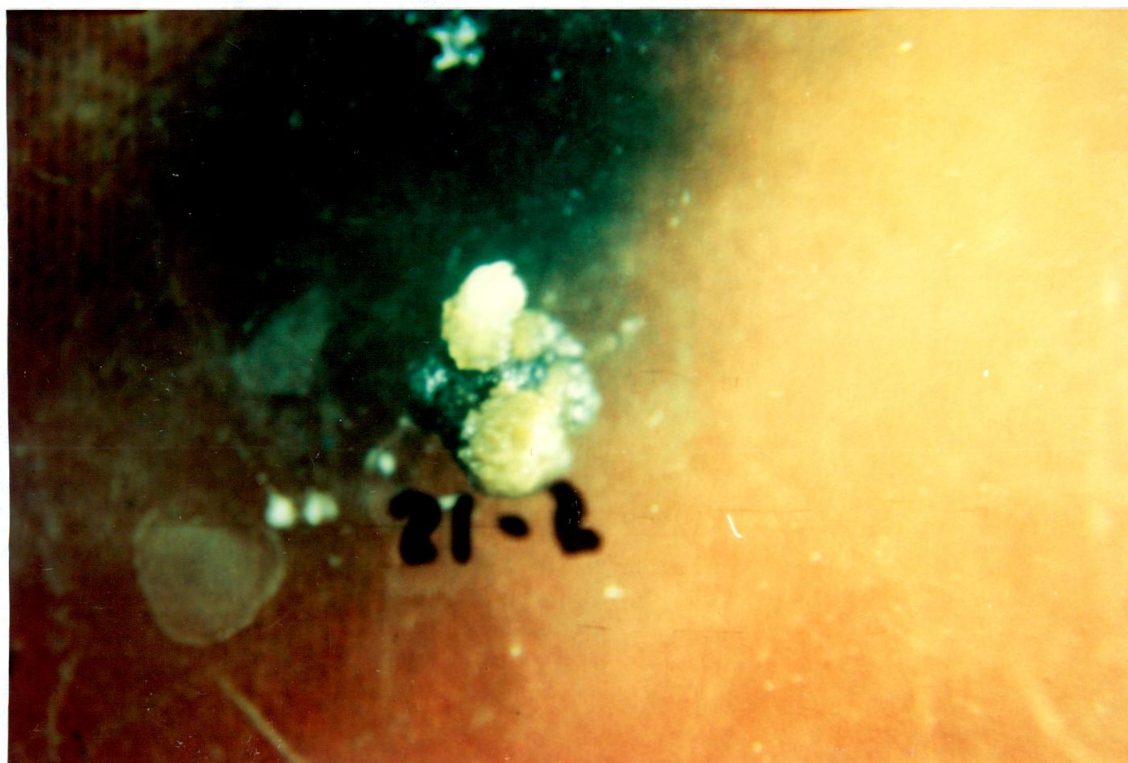


Figura 14. Callo embriogénico de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando la producción de más callo a partir del existente y la oxidación polifenólica que afectó el crecimiento de los embriones somáticos durante la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998.

cultivo de los explantes en los medios de multiplicación de callos, que pudieran influir en la tasa de división celular de manera que se continuara produciendo callo. Tampoco se pueden descartar aspectos genéticos propios del material vegetal del cual provenían los explantes.

Por el contrario, se presentaron otros callos embriogénicos que continuaron su proceso de producción de nuevos embriones, adicionales a los inicialmente formados (figura 15).

Esta respuesta no fue muy común y se observaron casos aislados sobre los tratamientos **T1** MS completo con ANA, **T2** MS½ sin ANA y **T5** MS completo sin ANA. En los tratamientos **T3** y **T4** fue donde más se observó este tipo de respuesta, presentándose para el caso del tratamiento **T4**, solo cuando se utilizó la ½ de las sales del MS y para el tratamiento **T3** en todos los casos.

De los embriones sembrados inicialmente, unos continuaron su desarrollo mientras que otros sufrieron variados niveles de oxidación que, en los casos más extremos, los condujeron a la muerte.

Como medida para contrarrestar la detención del crecimiento de los embriones se podrían transferir los embriones a nuevos medios de cultivo formulados especialmente para cada una de las etapas de desarrollo de manera que se promueva su maduración (dependiendo de la fase de desarrollo en que se encuentren). Esta alternativa implica desprender cuidadosamente los embriones de la masa callosa de la cual se originaron, a la vez que tiene la gran

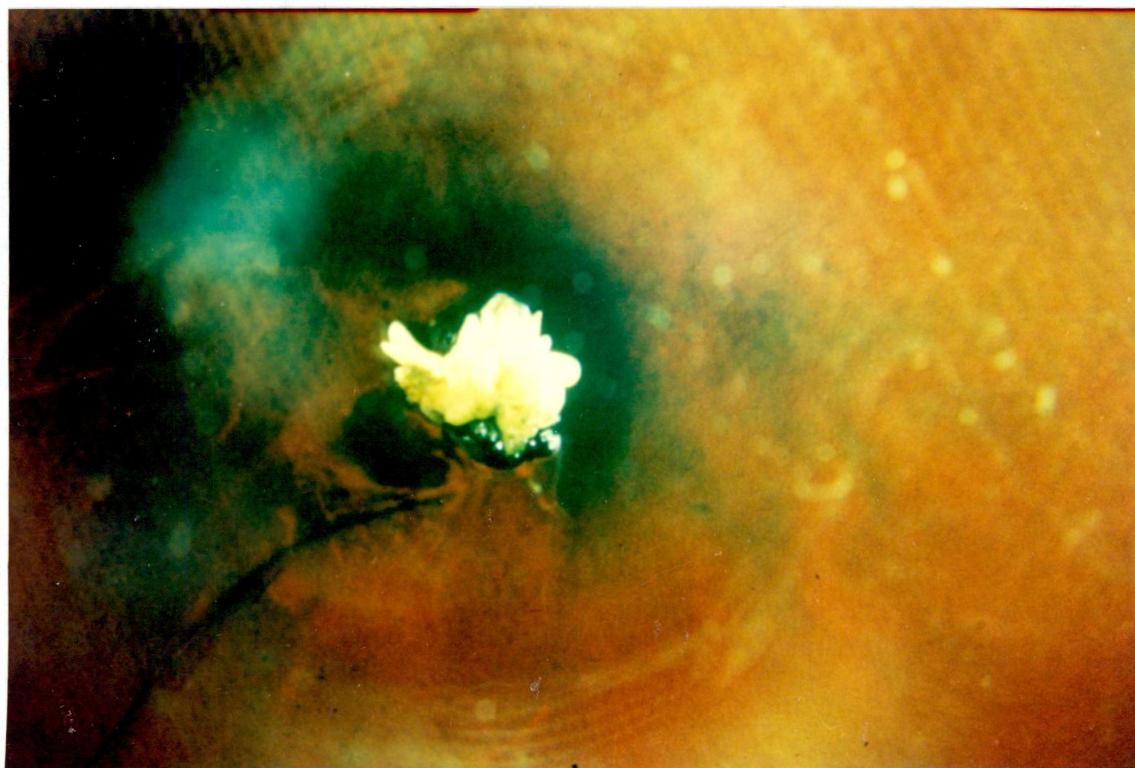


Figura 15. Callo embriogénico de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando la formación de embriones somáticos (adicionales a los inicialmente sembrados) durante la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998.

desventaja de hacer más complejo el proceso de la embriogénesis somática al requerir de un mayor número de medios de cultivos con formulaciones diferentes. Trabajando con distintas especies de *Musa*, algunos investigadores ya han diseñado diversas formulaciones de medios de cultivo para las diferentes etapas de desarrollo de los embriones somáticos aún cuando la eficiencia final de conversión en plántulas no ha sido la mejor. (Novak et al., 1990, 6). Se han obtenido buenos resultados en embriones somáticos derivados de flores masculinas inmaduras (Escalant et al., 1995, 21) o de embriones zigóticos de *Musa* (Escalant y Teisson, 1989, 667). De una forma o de otra se requiere optimizar el control de la oxidación polifenólica. El método de inmersión temporal ha mostrado ser eficiente en la reducción de la oxidación de diversos explantes cultivados, incluyendo los embriones somáticos. (Shii et al., citado por Escalant et al., 1995, 20).

4.4.2. Formación de raíces. El caso que se presentó con mayor frecuencia fue la tendencia de los explantes a emitir raíces.

La formación de raíces siguió en muchos casos la misma tendencia que mostró durante la fase de multiplicación de los callos, ya que éstas se producían directamente a partir de los fragmentos de los callos embriogénicos que servían como explantes (figura 16), confirmando la alta tendencia de los callos de plátano hartón a la producción de raíces, tal como lo han reportado otros trabajos de investigación en plátano. (Gómez et al., 1995, 236).

También se presentó el caso de embriones que, habiendo iniciado su proceso de diferenciación en plántulas sufrieron un alargamiento exagerado de la



Figura 16. Producción de raíces sobre callos embriogénicos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) durante la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998.

radícula con posterior formación de abundantes raíces, mientras que la parte superior correspondiente a la plúmula no crecía o lo hacía muy lentamente (figuras 17 y 18). En este evento ocurre un alargamiento del embrión el cual toma una forma de cabezuela en el extremo inferior (radícula). La radícula sigue creciendo alcanzando unos 2 a 4 cm, formando posteriormente pelos absorbentes de color blanco. Con el tiempo, estas raíces se comienzan a necrosar al igual que el embrión.

Dublin (1993, 586), explica que cualquiera que sea la naturaleza del explante de origen, el embrión somático tendrá al final de su diferenciación una zona radicular y una zona cauliforme. Según el equilibrio hormonal de los medios de diferenciación, estos embriones pueden presentar un desarrollo privilegiado de una u otra de estas dos zonas. Pueden incluso presentarse bloqueos en el desarrollo como resultado de la competencia por nutrimentos.

En los tratamientos donde se utilizó como citocinina el BAP hubo una mayor tendencia a la formación abundante de raíces cuando se empleó la concentración completa del medio MS que cuando se utilizó el MS^{1/2}. En cuanto a la presencia de auxinas, en las dosis más bajas de BAP (0.5-1.0 mg/l) la tendencia a producir más raíces se dio cuando no se añadió auxina al medio. En el caso donde se utilizó la mayor dosis de BAP, la tendencia fue al contrario (mayor producción de raíces con auxina cuando se usó el MS completo, y una tendencia igual en producción de raíces (con o sin ANA) cuando se empleó MS^{1/2}). En estos casos la producción de pelos absorbentes fue mayor cuando se usaron las mayores dosis de BAP.

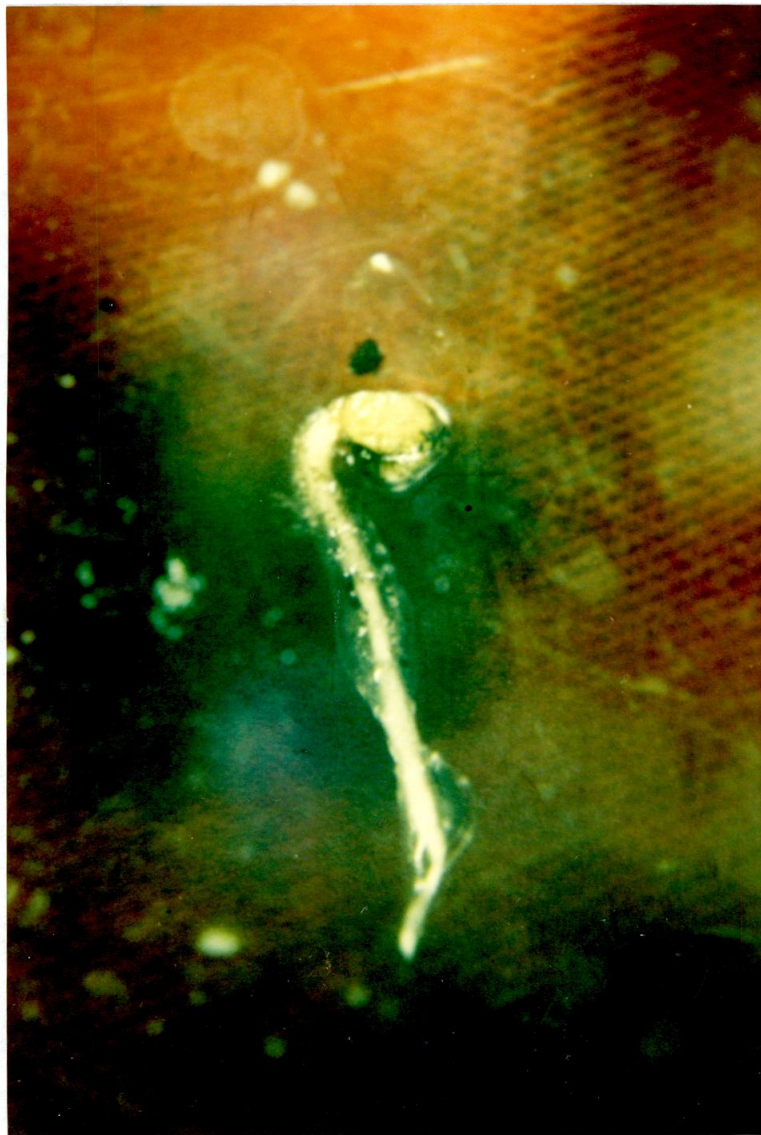


Figura 17. Embrión somático de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando el crecimiento exagerado de la raíz y el poco crecimiento de la plúmula. Santa Marta, 1998.



Figura 18. Embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando la emisión de raíces y ningún crecimiento de la plúmula durante la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998.

Al comparar los callos embriogénicos sometidos a tratamientos con kinetina, se produjeron raíces indistintamente con el MS completo o con el MS $\frac{1}{2}$, produciéndose cantidades similares de raíces en ambos casos, siendo en su mayoría raíces largas con abundantes pelos absorbentes. En cuanto a las dosis empleadas, la mayor cantidad de raíces se presentó utilizando 1.0 mg/l de kinetina, tanto con ANA como sin ANA.

La aparición de las primeras raíces fue bien temprana, pues éstas se detectaron por primera vez a los 11 días de efectuada la siembra en los medios de regeneración, correspondiendo al tratamiento T3 MS completo con ANA, donde precisamente se presentaron las mayores cantidades. En el tratamiento T5 MS $\frac{1}{2}$ sin ANA la emisión de raíces ocurrió a los 28 días de efectuada la siembra, siendo éste el tratamiento donde las raíces tardaron más tiempo en aparecer.

Una vez formadas las primeras, sobre los explantes continuaban formándose nuevas raíces. Con el tiempo las raíces se necrosaron y murieron.

4.4.3. Diferenciación de los embriones somáticos en plántulas. A pesar de la gran cantidad de embriones que fueron sembrados en cada uno de los medios durante la fase de regeneración, en términos generales la proporción de dichos embriones que lograron iniciar su proceso de diferenciación o germinación fue baja, y fue más baja aún la cantidad de ellos que lograron completarla y dar origen a una plántula. Muchos sufrieron una detención del crecimiento, situación que puede atribuirse al inadecuado control de la oxidación, al estrés experimentado después de los subcultivos luego de

separarlos de la masa callosa embriogénica en donde crecían o sencillamente a una inadecuada composición del medio de cultivo. En las figuras 19 y 20 se pueden apreciar los embriones somáticos sobre la masa callosa mostrando señales del inicio de la diferenciación en plántulas. Nótese además los niveles de oxidación sobre los callos y algunos embriones.

Por otro lado, los diferentes niveles de maduración que pudieran presentar los embriones somáticos (situación ilustrada en la figura 21), pudieron influir grandemente sobre el desarrollo y diferenciación en plántulas completas impidiendo obtener una buena producción de plantas vía embriogénesis somática, ya que se presume que en el momento en que fueron transferidos al respectivo medio de regeneración para inducir su germinación, muchos de ellos permanecían todavía inmaduros y el medio no resultó adecuado para completar su proceso de maduración.

Este problema acerca de la falta de sincronización de la embriogénesis somática ya ha sido discutido por otros investigadores quienes sugieren realizar un proceso de selección de los embriones somáticos maduros para uniformizar e incrementar de esta forma los porcentajes de germinación. (Lozoya, s.f., 57; Marroquín *et al.*, 1993, 45). En algunas especies ha dado resultado la adición de sustancias como el ácido abscísico (ABA) y el manitol al medio de cultivo proporcionando unos buenos niveles de sincronización del proceso de diferenciación (Marroquín *et al.*, 1993, 45); sin embargo, habría que hacer la evaluación de su comportamiento en callos embriogénicos de plátano hartón.

Teniendo esto en cuenta se puede decir que entre los factores que pudieron

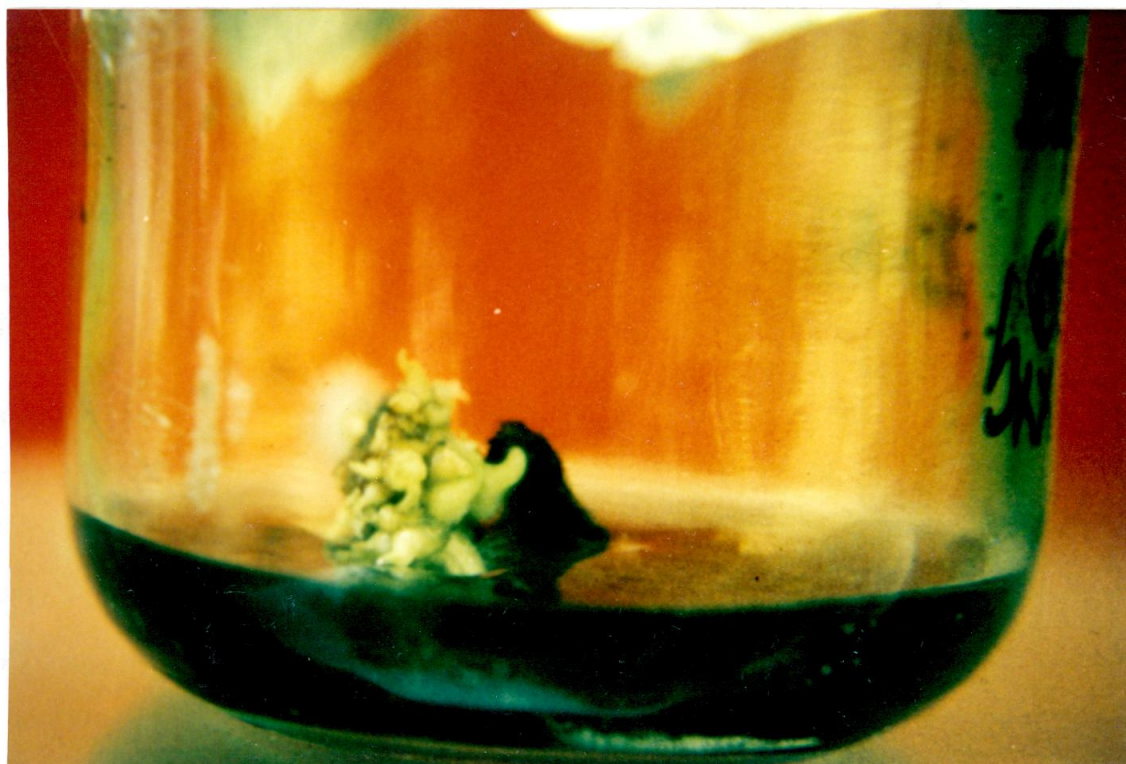


Figura 19. Numerosos embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) creciendo sobre callo embriogénico con altos niveles de oxidación polifenólica y mostrando el inicio del proceso de diferenciación en plántulas.. Santa Marta, 1998.

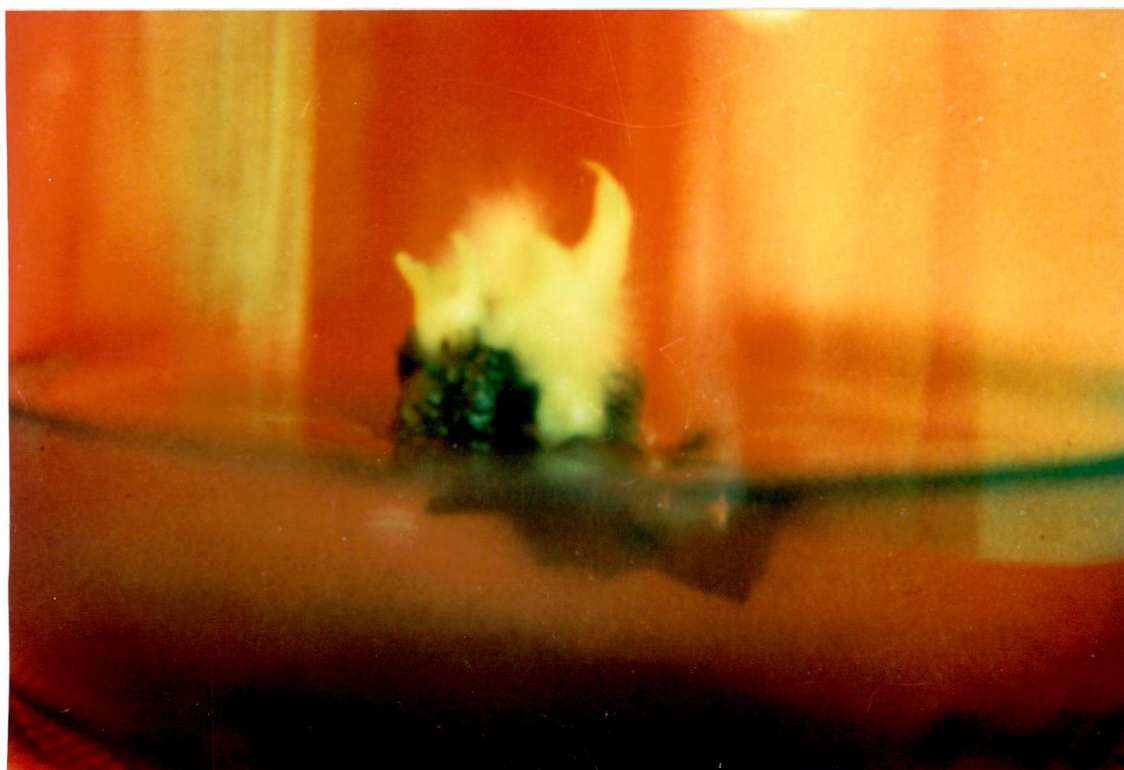


Figura 20. Embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) iniciando el proceso de diferenciación en plántulas creciendo sobre callo embriogénico que muestra señales de oxidación polifenólica y muerte de algunos embriones. Santa Marta, 1998.

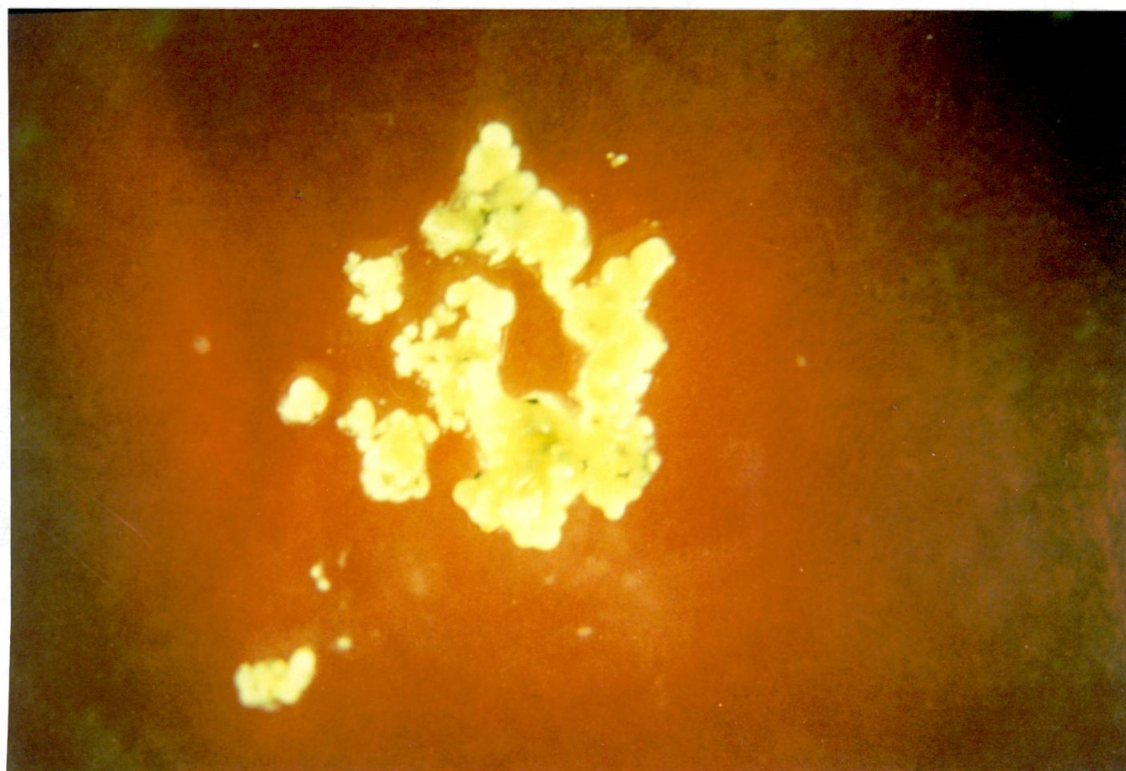


Figura 21. Abundantes embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) en diferentes estados de crecimiento sobre medio de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998.

incidir en el desarrollo errático de la regeneración de plantas completas están: el estado de maduración del embrión somático, la variabilidad en totipotencia, deficiencias o agotamientos del medio básico o la falta de control en la oxidación exagerada de algunos explantes, y que únicamente aquellos embriones que se encontraban en sus etapas más avanzadas de desarrollo pudieron convertirse en plántulas completas.

Se sabe por otros investigadores que para muchos cultivos un cambio en el tipo o concentración de auxinas es un paso necesario para el desarrollo de los embriones somáticos. (Ammirato, 1983, 99; George y Sherrington, 1984, 65). Sin embargo, en el caso del presente trabajo, el cambio del 2,4-D por la auxina ANA o la ausencia definitiva de auxinas en el medio no tuvo un efecto marcado sobre el desarrollo normal de los embriones en plántulas.

Si se quiere buscar una mayor y más uniforme germinación de los embriones, sería necesario entonces estandarizar un medio básico adecuado que permita la diferenciación de los embriones somáticos para luego aclarar el efecto de los diferentes fitorreguladores y sus dosis.

4.4.4. Número de plántulas formadas a partir de los embriones somáticos.

En este experimento se logró la regeneración completa de plántulas aunque en muy baja proporción con respecto al número de embriones sembrados inicialmente.

En la tabla 11 se reportan las cantidades de embriones somáticos que iniciaron su proceso de diferenciación en plántulas completas. De este total reportado,

Tabla 11. Número total de embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) que iniciaron su proceso de diferenciación en plántulas, de acuerdo con los tratamientos evaluados en la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998.

FACTOR 1 (MS)	FACTOR 2 (AUXINA)	EMBRIONES QUE INICIARON DIFERENCIACION						Σ
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	
MS COMPLETO	Con ANA	5	0	10	16	40	0	71
	Sin ANA	3	8	7	5	0	0	23
MS ½	Con ANA	8	35	50	29	14	0	136
	Sin ANA	39	12	39	40	0	3	133
SUMATORIA		55	55	106	90	54	3	363

solo unos pocos embriones lograron completar el proceso de diferenciación y dar origen a una plántula completa, pues su crecimiento se interrumpió mostrando síntomas de un severo oscurecimiento. Las posibles causas de esta respuesta ya han sido discutidas ampliamente en otras secciones de este trabajo.

Las cantidades totales de plántulas completas obtenidas a partir de embriones somáticos por cada tratamiento se reportan en la tabla 12, contabilizándose un total de 70 plántulas.

Analizando esta tabla se puede observar que al emplear la citocinina BAP solo se pudo obtener la germinación de embriones y posterior diferenciación de plántulas cuando se utilizó como base el medio MS con la concentración de las sales reducida a la mitad, mostrando además un mayor crecimiento de los embriones. Al utilizar el MS completo se obtuvo respuestas distintas a la diferenciación en plantas completas (raíces, proliferación de nueva masa callosa, entre otras).

En esta forma, para el MS a la mitad de la concentración, cuando se utilizó la dosis de 0.5 mg/l de BAP (T1) se logró obtener plántulas diferenciadas cuando no se utilizó auxina en la composición del medio. Sin embargo, si se tiene en cuenta la cantidad de embriones que inicialmente se sembraron, la proporción de estos que lograron germinar sigue siendo supremamente baja. En este caso se produjo un total de 13 plántulas completas, distribuidas en 6 ; 4 ; 1 y 2 plantas por unidad experimental.

Tabla 12. Número total de plántulas completas de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) diferenciadas a partir de embriones somáticos, de acuerdo a los diferentes tratamientos evaluados en la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998.

FACTOR 1	FACTOR 2	NUMERO DE PLANTULAS COMPLETAS						Σ
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	
(MS) COMPLETO	Con ANA	0	0	0	0	15	0	15
	Sin ANA	0	0	0	0	0	0	0
MS½	Con ANA	0	10	12	5	0	0	27
	Sin ANA	13	0	8	7	0	0	28
SUMATORIA		13	10	20	12	15	0	70

Al usar una dosis intermedia de 1.0 mg/l de BAP, correspondiente al tratamiento **T2**, se presentó el caso contrario, pues la diferenciación de plántulas se observó precisamente cuando se adicionó 1.0 mg/l de ANA al medio de cultivo, obteniéndose 3 ; 3 ; 4 y 0 plántulas por unidad experimental para un total de 10 plántulas formadas.

Con el tratamiento **T3**, en donde se utilizó la dosis mayor (1.5 mg/l de BAP) se produjo plántulas tanto en el medio sin ANA (0 ; 0 ; 3 y 5 plantas por unidad experimental, para un total de 8 plántulas), como en el suplementado con ANA (2 ; 2 ; 4 y 4 plántulas por unidad experimental, para un total de 12 plántulas). Los embriones mostraron un mayor crecimiento y en algunos explantes se produjo más embriones a partir de los iniciales, aún cuando se presentó necrosis de algunos de ellos.

Cuando en lugar de la citocinina BAP se utilizó la kinetina, las respuestas fueron las siguientes: Al utilizar la dosis de 0.5 mg/l de kinetina (tratamiento **T4**), solo se detectó la formación de plántulas para los medios con la mitad de la concentración de sales del MS, tanto con la adición de auxinas (1 ; 4 ; 0 y 0 plántulas por unidad experimental, para un total de 5 plántulas), como sin ella (0 ; 1 ; 5 y 1 plántulas por unidad experimental, para un total de 7 plántulas).

Utilizando 1.0 mg/l de kinetina (tratamiento **T5**), únicamente se detectó la diferenciación de embriones en plántulas cuando el medio contenía las sales completas del MS suplementadas con ANA (1.0 mg/l), siendo el único caso donde se observó diferenciación de embriones somáticos en plántulas completas utilizando el medio MS completo. Sin embargo, en este caso se

contabilizó el mayor número de plántulas completas (15 plántulas), distribuidas en 0 ; 4 ; 7 y 4 plantas por unidad experimental.

Para el tratamiento **T6** (1.5 mg/l de kinetina) no se detectó diferenciación completa de plántulas en ninguno de los explantes sometidos al efecto de este regulador, independientemente de la concentración de las sales del MS. En cambio se dio la formación de raíces a partir de callos embriogénicos (tanto con ANA como sin ANA).

En general, el medio MS a la mitad de la concentración permitió una mejor regeneración de plántulas. Además, si se analiza nuevamente la tabla 11, se observa un número aceptable de embriones que mostraron una diferenciación incompleta en plántulas. Inclusive, en muchos casos el número de estos embriones era mayor que cuando se utilizó el medio MS completo.

Analizando el comportamiento de las dos citocininas empleadas se puede deducir que el BAP parece tener efectos más benéficos sobre la germinación de los embriones que la kinetina, siendo necesario establecer la relación óptima de esta citocinina con la auxina para poder obtener plántulas de buen desarrollo. Además, se necesita mejorar los niveles de sincronización de los embriones de manera que se pueda partir de embriones somáticos que se encuentren en estados de crecimiento similares con lo que se uniformizaría su germinación y por consiguiente su diferenciación en plántulas. De igual forma se requiere controlar adecuadamente los niveles de oxidación. Es bien claro que el requerimiento por una citocinina es específico y que éstas son importantes en la maduración de los embriones somáticos y, en numerosas especies, esenciales

para el crecimiento o desarrollo de los embriones en plántulas. (Ammirato, 1983, 100).

La adición de carbón activado al medio de cultivo demostró tener efectos favorables para contrarrestar el efecto de la oxidación. Ammirato (1983, 100) y otros investigadores han discutido acerca de los beneficios de la incorporación del carbón activado al medio de cultivo y afirman que el carbón activado es capaz de absorber compuestos que potencialmente inhiben la embriogénesis somática (por ejemplo, los ácidos fenilacético y para-hidroxibenzoico). Sin embargo, también podría llegar a absorber cantidades sustanciales de auxinas y citocininas disminuyendo su efecto.

4.4.5. Tiempo de formación de plántulas. En la tabla 13 se indican los tiempos en los que se detectó el inicio de la diferenciación de embriones en plántulas.

La primera diferenciación de los embriones somáticos en plántulas completas se observó en el tratamiento T3 MS $\frac{1}{2}$ sin ANA a los 72 días de iniciada esta fase. La diferenciación más tardía de embriones en plántulas se detectó a los 89 días en el tratamiento T3 MS $\frac{1}{2}$ con ANA. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Dhed'a et al. quienes lograron la regeneración de plantas de plátano cultivar 'Bluggoe' a partir de suspensiones celulares en 98 días, sin embargo, en el trabajo de estos autores fue necesario el paso por 4 etapas con medios diferentes cada una. (1991,132).

Tabla 13. Días de formación de las primeras plántulas completas diferenciadas a partir de embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), de acuerdo a los diferentes tratamientos evaluados en la fase de regeneración de plantas. Santa Marta, 1998.

FACTOR 1 (MS)	FACTOR 2 (AUXINA)	DIAS APARICION PRIMERAS PLANTULAS					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
MS COMPLETO	Con ANA	0	0	0	0	88	0
	Sin ANA	0	0	0	0	0	0
MS½	Con ANA	0	89	79	80	0	0
	Sin ANA	88	0	72	84	0	0

4.4.6. Características de las plántulas regeneradas a partir de los embriones somáticos. Al iniciarse el proceso de diferenciación (en los casos donde esta se produjo) los embriones somáticos empiezan a mostrar un cambio de coloración a blanco-amarillo o blanco nacarado, tomando una forma característica (figura 22) haciéndose visible en la parte apical la plúmula, a partir de la cual paulatinamente se van formando unas hojas envolventes y el embrión toma entonces un color blanco-verdoso. Posteriormente o casi simultáneamente comienza a notarse la elongación de la radícula. La figura 23 ilustra el desarrollo de la plúmula, el cual es el principal evento morfológico en la germinación de los embriones somáticos. En esta figura también se observa el desarrollo de nuevas raíces en su parte inferior.

Inicialmente las plántulas recién formadas muestran unas pocas hojas envolventes no expandidas, algunas con producción de raíces,seudotallo de color amarillo verdoso muy claro (figura 24). Una vez transferidas al medio MS $\frac{1}{2}$ sin reguladores, dichas plántulas presentaron unas características similares a las plántulas regeneradas por la micropropagación convencional, mostrando hojas de una coloración verde claro, algunas ya expandidas,seudotallo delgado de color blando-cremoso y varias raíces largas de color blanco con abundantes pelos absorbentes (figura 25).

4.4.7. Observaciones al microscopio de la formación inicial. Las secciones histológicas de los embriones somáticos diferenciados (en etapa de torpedo) muestran claramente a una estructura bipolar con los ápices del vástago y la raíz conectados por elementos vasculares y rodeada completamente por una epidermis (figura 26 y 27). Haccius, citado por Williams y Maheswaran,

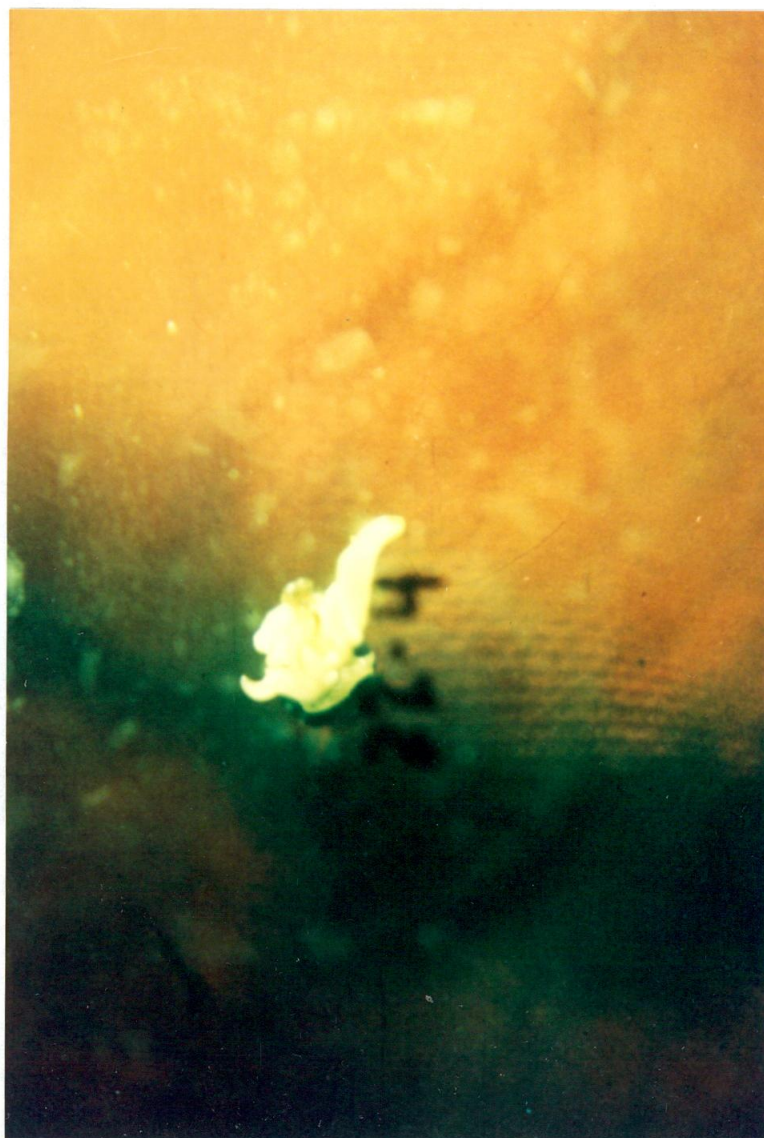


Figura 22. Embriones somáticos de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) en proceso de diferenciación de plántulas mostrando la forma y coloración características de esta etapa del crecimiento. Santa Marta, 1998.





Figura 23. Embrión somático de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds), diferenciándose en plántulas mostrando el desarrollo de la plúmula y la formación de raíces. Santa Marta, 1998.



Figura 24. Plántula de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) recién formada a partir de un embrión somático. Santa Marta, 1998.



Figura 25. Plántulas de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de embriones somáticos, creciendo en un medio MS $\frac{1}{2}$ sin reguladores. Santa Marta, 1998.



Figura 26. Vista al microscopio (10X) de un embrión somático de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando la plúmula, la radícula y las conexiones vasculares que lo caracterizan. Santa Marta, 1998.

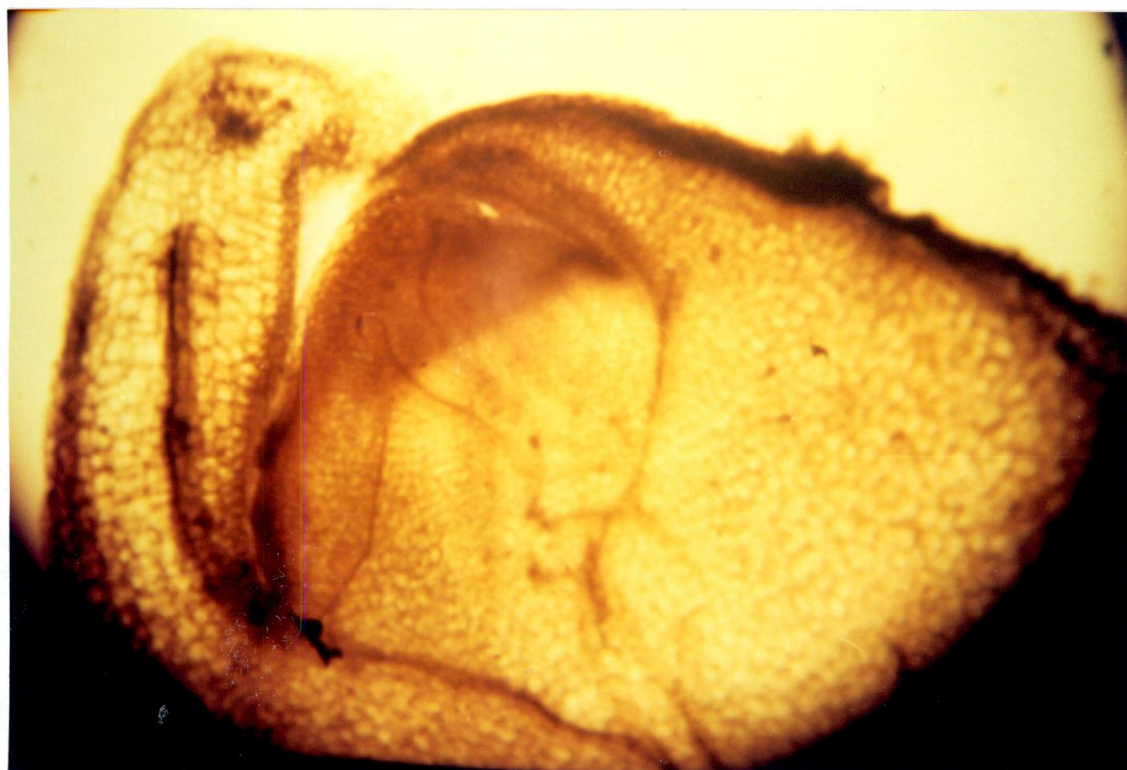


Figura 27. Vista al microscopio (40X) de la parte superior de un embrión somático de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) mostrando el tejido meristemático. Santa Marta, 1998.

consideró tales conexiones vasculares cerradas entre el vástago y el ápice radical como características más distintivas de un embrión. (1986, 446)

5. CONCLUSIONES

- * Trabajando con explantes procedentes del campo, el explante ideal para lograr una buena producción de callo es el meristemo apical con varios primordios de hoja, siendo posible obtener callos aproximadamente un mes después de la siembra.
- * El explante tipo “zona meristemática o base del cormo” no es una buena fuente de producción de callo y se debe descartar como tal.
- * Para lograr una eficiente producción de callo embriogénico en plátano hartón es necesario controlar adecuadamente la alta oxidación polifenólica que presentan los explantes provenientes de campo (que afectan el crecimiento de callos y embriones somáticos) y elaborar un programa de subcultivos más frecuentes durante la fase de iniciación (semanales).
- * Para explantes tipo meristemo apical de plátano hartón procedentes del campo es suficiente una dosis de 0.5 mg/l de 2,4-D para lograr buenos niveles de producción de callo, siendo innecesario utilizar dosis más altas que puedan tener efectos detrimentales en la cantidad y/o calidad del callo producido.
- * La combinación de auxinas (2,4-D o dicamba) con el BAP, aunque no es necesaria para la obtención de callo, influye en las características cualitativas y mejora ligeramente los niveles de producción de los callos.

- * En explantes de plátano hartón tipo meristemo apical procedentes del campo, el 2,4-D responde mejor como auxina inductora de callo que el dicamba.
- * Los callos de plátano hartón se pueden clasificar en tres clases distinguibles morfológicamente y por diferentes potenciales de regeneración (tipos I, II y III).
- * El callo ideal para estudios de embriogénesis somática es el que presenta consistencia suave o esponjosa, friable y con una buena tasa de crecimiento. Este tipo de callo podría ser ideal para la obtención de suspensiones celulares o manipulación genética.
- * Por la cantidad de embriones somáticos producidos sobre callos de plátano hartón y potencialmente capaces de diferenciarse en plantas, la embriogénesis somática es un sistema de cultivo con un gran potencial para la propagación masiva de esta especie.
- * Los embriones somáticos requieren de una etapa de maduración en un medio condicionado especialmente para dicho fin antes de inducirlos a la regeneración de plantas.
- * El medio MS^{1/2} posibilita una mayor y más uniforme germinación de los embriones, aún cuando es necesario estandarizar los suplementos de reguladores para mejorar los niveles de conversión de embriones en plántulas.

BIBLIOGRAFIA

ABBOT, A. Practice and promise of micropropagation of woody species. En : Acta horticulturae. No. 79 (1978); p. 79.

ALONI, R. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. En : Planta. Vol. 150, No. 3 (1980); p. 255.

AMMIRATO, P. Embriogenesis. En : Evans, D. et al. Handbook of plant cell culture : Techniques for propagation. Nueva York : MacMillan, 1983. v. 1, p. 82-123.

BARBA A., A. Cultivo de callos. En : HURTADO M., Daniel y MERIÑO M., María. Cultivo de tejidos vegetales. México : Trillas, 1980. p. 93-100.

BERMUDEZ Z., Oscar y LEON O., Jesús. Manual teórico práctico de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Santa Fé de Bogotá : El autor, 1994. p. 53-60.

BIEBERACH F., C. Embriogénesis somática y regeneración de plantas en el cultivo de *Musa*. En : Infomusa. Vol. 4, No. 1. (jun. 1995); p. 16.

DHED'A, D. et al. Plant regeneration in cell suspension culture of the cooking banana cv. "Bluggoe" (*Musa* spp. ABB group). En : Fruits. Vol. 46, No. 2 (1991); p. 125-135.

DUBLIN, P. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En : ROCA, William y MROGINSKI, Luis. Cultivo de tejidos en la agricultura : Fundamentos y aplicaciones. Cali : CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT), 1993. p. 577-619.

ESCALANTE, J.; TAPIA, A. y SANDOVAL, J. Inducción de callos, suspensión de células y posibilidades de regeneración en *Musa* sp. previa presión de selección. En : REUNION ACORBAT (9ª ; 1989 ; Maracaibo). Memorias de la IX Reunión ACORBAT. Maracaibo : ASOCIACION PARA

LA COOPERACION EN INVESTIGACIONES BANANERAS EN EL CARIBE Y EN AMERICA TROPICAL (ACORBAT), 1991. p. 35-42.

ESCALANTE, J. y TEISSON, C. Somatic embryogenesis and plants from immature zygotic embryos of species *Musa acuminata* and *Musa balbisiana*. En : Plant cell reports. Vol. 7 (1989). p. 665-668.

ESCALANTE, J. et al. Embriogénesis somática de bananos y plátanos a partir de flores jóvenes. En : Infomusa. Vol. 4, No. 2 (1995); p. 20-21.

GEORGE, E. and SHERRINGTON, P. Plant propagation by tissue culture : Handbook and directory of comercial laboratories. Eversley : Exegeties, 1984. p. 17-18, 65-66.

GOMEZ, Kosky et al. Obtención de callo y regeneración de plantas en diferentes clones de plátano y banano (*Musa* sp). En : Agronomía tropical. Vol. 45, No. 2 (1995); p. 233-246.

HURTADO M., Daniel y MERIÑO M., María. Cultivo de tejidos vegetales. México : Trillas, 1980. 232 p.

KRIKORIAN, A. Callus and cell culture, somatic embryogenesis, androgenesis and related technique for *Musa* improvements. En : Banana and plantain breeding strategies : International Workshop (1° ;1986 ; Cairns). Banana and plantain breeding strategies : Proceedings of an international workshop. Cairns : RED INTERNACIONAL PARA EL MEJORAMIENTO DEL BANANO Y EL PLATANO (INIBAP), 1986. p. 128-135.

LITZ, R. y JARRET, R. Regeneración de plantas en cultivos de tejidos : Embriogénesis somática y organogénesis. En : ROCA, William y MROGINSKI, Luis. Cultivo de tejidos en la agricultura : Fundamentos y aplicaciones. Cali : CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT), 1993. p. 143-172.

LIU, Lij et al. In vitro propagation of plantain (*Musa acuminata* x *M. balbisiana*, AAB) and banana (*M. acuminata*, AAA) in Puerto Rico. En : Agric. Univ. Vol. 73, No. 1 (ene. 1989); p. 51-58.

LOZOYA S., Héctor. Embriogénesis somática. En : VILLALOBOS, Víctor.

Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Turrialba : CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA (CATIE), s.f. p. 55-60.

MARROQUIN C., Claudia et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration through cell suspensions in *Musa acuminata*. En : In vitro cell. Vol. 29 (ene. 1993); p. 43-46.

NOVAK, F. Plant tissue culture techniques for mutation breeding : A training manual. Seibersdorf : ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION (FAO), 1988. p. 59.

NOVAK, F. et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration in suspension cultures of dessert (AA y AAA) and cooking (ABB) bananas (*Musa* spp.). En : Biotechnology. Vol. 2, No. 3 (1990); p. 5-10.

NOVAK, F. et al. Embriogénesis Somática y mutaciones inducidas mediante el cultivo *in vitro* del banano y plátano (*Musa* spp). En : REUNION ACORBAT (9ª ; 1989 ; Maracaibo). Memorias de la IX Reunión ACORBAT. Maracaibo : ASOCIACION PARA LA COOPERACION EN INVESTIGACIONES BANANERAS EN EL CARIBE Y EN AMERICA TROPICAL (ACORBAT), 1991. p. 99-107

OKOLE, B. and SCHULZ, F. Micro-cross sections of banana and plantains (*Musa* spp.) : Morphogenesis and regeneration of callus and shoots buds. En : Plant science. No. 116 (1996); p. 185-195.

PEREA D., Margarita. La biotecnología en plátano y banano. En: Augura. Vol. 1, No. 18 (1995); p. 56-63.

PONS, Susana. Contribución al estudio de la inducción de callos a partir de anteras de musaceae. En : ACEVIV : Boletín científico. Vol. 2, No. 3 (1990); p. 5-10.

ROCA, William y MROGINSKI, Luis. Establecimiento de cultivo de tejidos vegetales *in vitro*. En: _____. Cultivo de tejidos en la agricultura : Fundamentos y aplicaciones. Cali : CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT), 1993. p. 19-40.

SANDOVAL, F. y Muller, L. Influencia del tamaño del explante en la propagación *in vitro* de cuatro cultivares de *Musa*. En : REUNION ACORBAT (7ª; 1987 ; Turrialba). Memorias de la VII Reunión ACORBAT. Turrialba : CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA (CATIE), 1987. p. 87-97.

SCHOOFS, Hilde. Origen de células embriónicas en *Musa*. En : Infomusa. Vol. 6, No. 1 (jun. 1997); p. 32-33.

SZABADOS, L., MROGINSKI, L. y ROCA, W. Suspensiones celulares : Descripción, manipulación y aplicaciones. En : ROCA, William M. y MROGINSKI, Luis. Cultivo de tejidos en la agricultura : Fundamentos y aplicaciones. Cali : CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT), 1991. p. 173-210.

TRUJILLO, I. y GARCIA, E. Estrategias para la obtención de variantes somaclonales resistentes a la sigatoka amarilla. En : Infomusa. Vol. 5, No. 2 (dic. 1996); p. 12.

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA (U.C.V.). Curso regional de capacitación OIEA/FAO sobre técnicas de mutación e *in vitro* para el mejoramiento de cultivos. Caracas : U.C.V, 1995. p. 13-14.

VILLALOBOS, V. y THORPE, T. Micropropagación : Conceptos, metodologías y resultados. En : ROCA, William M. y MROGINSKI, Luis. Cultivo de tejidos en la agricultura : Fundamentos y aplicaciones. Cali : CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT), 1993. p. 127-141.

WILLIAMS, E. and MAHESWARAN, G. Somatic embryogenesis : Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. En : Annals of Botany. Vol. 57 (1986); p. 443-462.

ANEXOS

Anexo A. Constitución del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962)

CONSTITUYENTES	mg/l
Nitrato de amonio (NH_4NO_3)	1650.000
Nitrato de potasio (KNO_3)	1900.000
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	170.000
Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	370.000
Sulfato de manganeso tetrahidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	22.300
Cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	440.000
Sulfato de zinc pentahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	8.600
Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Ioduro de potasio (KI)	0.830
Cloruro de cobalto hexahidratado ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.025
Acido bórico (H_3BO_3)	6.200
Molibdato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.250
Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	27.800
EDTA de sodio ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37.300
Tiamina	0.100
Glicina	0.500
Acido nicotínico	0.500
Piridoxina	0.500
Mioinositol	100.000
Sacarosa	30000.000

Fuente : Roca, William y Mroginski, Luis. 1993

ANEXO B. Análisis de varianza para peso del callo (en gramos) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano Hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.

F. VARIACION	G.L.	S.C	C.M.	F.C	F 5%	F 1%
TRATAMIENTO	7	1.682	0.24	5.333**	2.66	4.06
ERROR	16	0.724	0.045			
TOTAL	23	2.405				

** Diferencia altamente significativa

ANEXO C. Prueba de Tukey para peso del callo (en gramos) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano Hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.

TRATAMIENTOS		a	g	b	h	d	c	f	e
		0.801	0.770	0.574	0.560	0.432	0.212	0.098	0.093
e	0.093	0.708*	0.677*	0.481	0.467	0.339	0.119	0.05	
f	0.098	0.703*	0.678*	0.476	0.462	0.334	0.114		
c	0.212	0.598	0.558	0.362	0.348	0.220			
d	0.432	0.369	0.371	0.142	0.128				
h	0.560	0.241	0.210	0.014					
b	0.574	0.227	0.196						
g	0.770	0.002							
a	0.801								

* Diferencia significativa

$$W_{0.05} = 0.597$$

$$W_{0.01} = 0.741$$

ANEXO D. Análisis de varianza para tiempo de formación del callo (en días) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.

F. VARIACION	G.L.	S.C	C.M.	F.C	F 5%	F 1%
TRATAMIENTO	7	3305.625	472.232	16.52**	2.66	4.06
ERROR	16	45.333	28.583			
TOTAL	23	3762.958				

** Diferencia altamente significativa

Anexo E. Prueba de Tukey para tiempo de formación de callo (en días) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.

TRATAMIENTOS	f	h	c	e	g	b	a	d
	60.0	57.6	54.3	53.0	35.0	33.3	32.6	31.6
d 31.6	28.4**	26.0**	22.7**	21.4**	3.4	1.7	1.0	
a 32.6	27.4**	25.0**	21.7**	20.4**	2.4	0.7		
b 33.3	27.0**	24.3**	21.0**	19.7**	1.7			
g 35.0	25.0**	22.6**	19.3**	18.0*				
e 53.0	7.0	4.6	1.3					
c 54.3	5.7	3.3						
h 57.6	2.4							
f 60.0								

* Diferencia significativa

** Diferencia altamente significativa

$$W_{0.05} = 15.121$$

$$W_{0.01} = 18.762$$

ANEXO F. Análisis de varianza para tasa de crecimiento del callo (en miligramos de callo/día) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.

F. VARIACION	G.L.	S.C	C.M.	F.C	F 5%	F 1%
TRATAMIENTO	7	324.552	46.364	5.247**	2.66	4.03
ERROR	16	141.386	8.836			
TOTAL	23	465.938				

** Diferencia altamente significativa

Anexo G. Prueba de Tukey para tasa de crecimiento callo (en miligramos de callo/día) producido en explantes tipo meristemo apical de plátano hartón (*Musa* AAB Simmonds) provenientes de campo. Santa Marta, 1998.

Tratamientos	h	a	g	b	d	c	f	e
	11.56	10.76	10.34	7.83	5.75	4.04	2.11	1.75
e 1.75	9.81*	9.00*	8.59*	6.08	4.00	2.29	0.36	
f 2.11	9.45*	8.66*	8.32	5.72	6.64	1.93		
c 4.04	7.56	6.76	6.30	3.79	1.71			
d 5.75	5.81	5.75	4.59	2.08				
b 7.83	3.73	2.93	2.51					
g 10.34	1.22	0.42						
a 10.76	0.80							
h 11.56								

* Diferencia significativa

$$W_{0.05} = 8.408$$

$$W_{0.01} = 10.43$$

